ORSAY
n° d'ordre :
2096

THESE

présentée

à

l'UNIVERSITE DE PARIS XI

CENTRE D'ORSAY

pour obtenir le titre de Docteur de 3ème Cycle

Spécialité : Biochimie

par

Hyone - Myong EUN

ETUDE DE L'ACTIVITE D,D-CARBOXYPEPTIDASIQUE DE FRAGMENTS MEMBRANAIRES DE *Mycobacterium smegmatis* ATCC 21732 : SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES DU TYPE β-LACTAME.

Soutenue le 14 juin 1976 devant la Commission d'Examen.

M. E. LEDERER		Président
Mle. J. YON	)	Examinateurs
M. J.F. PETIT	)	

THESE

présentée

à

l'UNIVERSITE DE PARIS XI

CENTRE D'ORSAY

pour obtenir le titre de Docteur de 3ème Cycle

Spécialité : Biochimie

par

Hyone - Myong EUN

ETUDE DE L'ACTIVITE D,D-CARBOXYPEPTIDASIQUE DE FRAGMENTS MEMBRANAIRES DE *Mycobacterium smegmatis* ATCC 21732 : SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES DU TYPE β-LACTAME.

Soutenue le 14 juin 1976 devant la Commission d'Examen.

M. E. LEDERER		Président
Mle. J. YON	)	Examinateurs
M. J.F. PETIT	)	

A mes parents

父母亲

" Heaven helps those who help themselves."

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Je suis très heureux de pouvoir exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur le Professeur E. Lederer pour la confiance qu'il m'a accordée en m'accueillant dans son laboratoire et pour le soutien qu'il m'a apporté depuis mon arrivée en France.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance particulière à Monsieur J. F. Petit pour tout ce qu'il m'a offert tout au long de mon séjour en sa compagnie. Il m'a "gâté" en dirigeant ce travail grâce à ses connaissances scientifiques et à sa gentillesse exceptionnelle.

Monsieur A. Yapo a assumé une part importante dans la réalisation de ce travail, notamment dans la préparation des substrats radioactifs; je lui adresse mes plus sincères remerciements pour sa collaboration et sa grande amabilité.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Mademoiselle le Professeur J. Yon, qui a accepté aimablement de faire partie du Jury de ma thèse, pour l'intérêt qu'elle a manifesté envers mon travail et pour les connaissances qu'elle a bien voulu me prodiguer.

J'adresse mes vifs remerciements à Madame G. Lemaire qui m'a aidé à commencer ce travail.

Je suis très reconnaissant à Monsieur C. Ghelis qui a bien voulu apporter ses conseils et ses critiques constructifs.

Je voudrais remercier Monsieur le Professeur J. M. Ghuysen de toutes les informations et conseils dont il m'a fait profiter.

Je remercie également Monsieur J. van Heijenoort de l'intérêt et des critiques qu'il a portés à mon travail.

C'est dans le laboratoire de Monsieur le Professeur I. W. Park (Séoul) que j'ai fait mes premiers pas dans la Recherche; qu'il accepte l'expression de ma vive reconnaissance.

Ce travail de thèse terminé, je voudrais exprimer ma sincère reconnaissance à mes ami(e)s non seulement du laboratoire, mais aussi de l'extérieur qui m'ont aidé et encouragé, et en particulier à Madame J. Jalicot-Calinescu qui a assuré la dactylographie de ce texte avec gentillesse et compétence.

Que notre groupe de "Shouters" trouvent ici une occasion de "shouter" encore plus.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548104_0009

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS 2

INTRODUCTION GENERALE 3

A. Généralités sur la paroi bactérienne 4
B. Biosynthèse du peptidoglycane 5
C. Enzymes intervenant dans la formation de la liaison interpeptidique 9
D. La paroi des Mycobactéries 10

CHAPITRE I -

ETUDE GENERALE DES ENZYMES PARTICULAIRES 12

INTRODUCTION 13

I. Culture des microorganismes 15
II. Préparation des enzymes particulaires 15
III. Activités enzymatiques des enzymes particulaires 17

1) Distribution de l'activité D, D-carboxypeptidasique 17
2) Activité D, D-carboxypeptidasique en fonction du temps d'incubation 17
3) Activité D, D-carboxypeptidasique en fonction de la concentration en protéines des enzymes particulaires 17
4) Mise au point des conditions d'incubation 19
4.1 pH optimal de l'activité D, D-carboxypeptidasique 19
4.2 Influence de la force ionique 19
4.3 Effets des cations divalents 21
4.4 Recherche de la température optimale 21
4.5 Effets des détergents non-ioniques 21
5) Solubilisation de l'activité D, D-carboxypeptidasique membranaire par des détergents non-ioniques 23
6) Détermination des constantes enzymatiques: Km et V. 24
7) Effets de la conservation 25
7.1 Stabilité des enzymes solubilisés à la température ordinaire 25
7.2 Conservation à -20° 25
a) Influence sur l'activité D, D-carboxypeptidasique 25
b) Influence sur les constantes enzymatiques 26

DISCUSSION 29

1) Activité enzymatique des enzymes particulaires..... 29
2) Effets de détergents non-ioniques 30
3) Comparaison des valeurs de Km et V de M. smegmatis avec celles d'autres D, D-carboxypeptidases 31
4) Signification du changement des constantes enzymatiques 31

CHAPITRE II -

ETUDE DE L'ACTION DES ANTIBIOTIQUES 33

INTRODUCTION 34

I. Action des antibiotiques sur la croissance de M. smegmatis ATCC 21732..... 39

1) Pénicilline G..... 39
2) Ethambutol 40
3) Autres antibiotiques 41
3.1 Antibiotiques du type β-lactame..... 41
3.2 Rifampicine, streptomycine et D-cyclosérine. 41
II. Action des antibiotiques sur l'activité D, D-carboxypeptidasique 41

1) Etude de l'inhibition par la pénicilline G..... 41
1.1 Action sur les enzymes frais
a) Activité D, D-carboxypeptidasique en fonction de la concentration en pénicilline G. 41
b) Cinétique d'inhibition de la D, D-carboxypeptidase..... 42
1.2 Effets de la conservation à -20° sur l'inhibition de l'activité D, D-carboxypeptidasique ... 42
a) Cinétique d'inhibition 42
b) Activité D, D-carboxypeptidasique en fonction de la concentration en pénicilline G. 47
2) Etude de l'inhibition par d'autres antibiotiques 47
3) Réversibilité par dialyse de l'inactivation des enzymes par la pénicilline G 47

DISCUSSION 52

1) Relation entre la sensibilité des cellules entières et de certains enzymes à divers antibiotiques..... 54
2) Mécanisme d'action de la pénicilline 54

CHAPITRE III -

MATERIEL ET METHODES 57

I. Produits..... 58
II. Préparation des substrats..... 58

1) Préparation des substrats froids: UDP-MurNglyc-L-Ala-γ-D-Glu-meso-A_2pm et UDP-MurNglyc-L-Ala-γ-D-Glu-meso-A_2pm-D-Ala-D-Ala. 58
2) Préparation des substrats marqués au ^{14}C 59
2.1 D-(^{14}C)alanyl-D-(^{14}C)alanine 59
2.2 UDP-MurNglyc-L-Ala-γ-D-Glu-meso-A_2pm-D-(^{14}C)Ala-D-(^{14}C)Ala. 59
2.3 N-glycolylmuramyl-(^{14}C)pentapeptide 60
2.4 N-glycolylmuramyl-(^{14}C)tetrapeptide 60

III. Méthodes bactériologiques 60
1) Milieu de Brodie 60
2) Milieu au "Heart Bouillon" 61
2.1 Boite de Petri - "Heart Bouillon" gélosé 61
2.2 Tubes inclinés de "Heart Bouillon" à la gélose molle. 61
3) Milieu de Jensen 61
3.1 Milieu de Jensen sans antibiotique 61
3.2 Milieu de Jensen imprégné d'antibiotiques 61
4) Culture sur boite de Petri 61

IV. Méthodes analytiques 62
1) Essai standard de l'activité D, D-carboxypeptidasique 62
2) Dosage des protéines 62
3) Composition en acides aminés 62
4) Dosage des hexosamines totales par la méthode d'Elson-Morgan modifiée par Belcher et al. 63
5) Méthodes de séparation 63
5.1 Chromatographie sur colonne 63
5.2 Chromatographie sur papier 63
5.3 Electrophorèse sur papier 63
5.4 Révélation des chromatogrammes et des électrophorégrammes 64
5.5 Comptage de la radioactivité 65
5.6 Gel de phosphate de calcium 65

RESUME ET CONCLUSION 66

SUMMARY 69

BIBLIOGRAPHIE 72

ABREVIATIONS UTILISEES

GlcNAc : N-acétylglucosamine.

MurNAc : acide N-acétylmuramique.

MurNglyc : acide N-glycolylmuramique.

UDP : uridine diphosphate.

meso-A_2pm ou meso-Dap : acide meso-α, ϵ-diaminopimélique.

UDP-MurNglyc-pentapeptide:
UDP-MurNglyc-L-Ala-γ-D-Glu-meso-A_2pm-D-Ala-D-Ala.

UDP-MurNglyc-(^{14}C)pentapeptide:
UDP-MurNglyc-L-Ala-γ-D-Glu-meso-A_2pm-D-(^{14}C)Ala-D-(^{14}C)Ala.

MurNglyc-(^{14}C)tetrapeptide:
N-glycolylmuramyl-L-Ala-γ-D-Glu-meso-A_2pm-D-(^{14}C)Ala.

Carbowax : polyéthylèneglycol (Serva).

TCA : acide trichloracétique.

Genapol X-100 : tridécanol-polyglycol-éther (n = 10) (Hoechst AG).

SDS : dodécyl sulfate de sodium.

Triton X-100 : octylphénoxy-polyéthoxyéthanol (n = 10) (Sigma).

Tween 80 : polyoxyéthylènesorbitane monooléate (Merck).

Tris : tris-hydroxyméthylaminométhane (Merck).

PPO : 2, 5-diphényloxazole (NEN).

Bis-MSB : p-bis-(o-méthylstyril)-benzène (NEN).

USAGE CONVENTIONNEL

Unité Internationale (UI) de pénicilline = 0, 0005988 mg.

Classification de l'Union Internationale de Biochimie:

DD-carboxypeptidase (EC 3.4.12.6)

β-lactamase ou pénicillinase (EC 3.5.2.6)

Unité de radioactivité : 1 Curie = 2, 22 x 10^{12} dpm.

AVANT-PROPOS

Si l'on me demandait: "Pourquoi avez-vous choisi les Mycobactéries pour vos études ?", je répondrais de la façon suivante:

Depuis la découverte du bacille tuberculeux en 1882 par Robert Koch, ces redoutables agents pathogènes nommés "Mycobactéries" ont suscité un intérêt incessant. De nombreux travaux réalisés dans le but de "maîtriser les Mycobactéries" par des laboratoires de renommée mondiale ont porté surtout sur des études de l'activité immunologique de la cellule entière et de la paroi.

Notre laboratoire à Orsay, dirigé par E.Lederer et J.F.Petit, a apporté une contribution remarquable non seulement à l'étude de l'activité immunologique mais, en plus, à l'élucidation de la structure chimique de la paroi mycobactérienne. Nous constatons aujourd'hui que les données acquises sont tellement abondantes que des études enzymatiques sont devenues une nécessité. A cet égard sont énumérées dans l'INTRODUCTION certaines des caractéristiques de la paroi mycobactérienne, après un bref rappel des schémas généraux de la biosynthèse du peptidoglycane.

Si l'on me demandait: "Qu'est-ce que vous voulez voir avec les Mycobactéries ?" , ma réponse serait la suivante:

Il faut d'abord souligner que la structure chimique de la paroi mycobactérienne n'est pas encore suffisamment connue. Nous avons alors entrepris l'étude de la biosynthèse du peptidoglycane par la voie enzymatique dans l'espoir d'y ajouter un autre spectre de données.

Le système enzymatique intervenant à l'étape de la transpeptidation est l'objet de l'étude développée dans le Chapitre I. Nous présentons dans le Chapitre II nos études sur les interactions de ce système enzymatique avec la pénicilline en vue d'apporter une explication au phénomène mal connu de l'insensibilité de Mycobacterium smegmatis à la pénicilline et aussi d'élucider le mode d'action de cet antibiotique.

Si l'on me demandait: "Qu'avez-vous obtenu à partir de ces efforts ?", je dirais avec certitude que "comme vous le voyez dans le Résumé et la Conclusion , la preuve de ce que nous venons d'exposer demande, comme d'habitude, une autre preuve".

INTRODUCTION

GENERALE

INTRODUCTION

A - Généralités sur la paroi bactérienne.

La diversité morphologique des bactéries est due à la présence à l'extérieur de leur cellule d'une structure rigide qui est la paroi. L'étude chimique de cette structure exocellulaire a commencé quand la paroi a été isolée pour la première fois à partir de bactéries broyées mécaniquement (Salton, 1952). Les progrès importants réalisés depuis lors dans ce domaine ont fait l'objet de nombreux ouvrages et revues (Salton, 1964; Weidel et Pelzer, 1964; Rogers et Perkins, 1968; Ghuysen, 1968; Ghuysen et Shockman, 1973; Blumberg et Strominger, 1974; Schleifer, 1975). La paroi des bactéries se caractérise par la présence d'un hétéropolymère appelé "peptidoglycane" ou aussi quelquefois "mucopeptide" ou "muréine". Ce composant est apparemment une caractéristique universelle dans le monde prokaryote à quelques exceptions près comme chez les mycoplasma.

Le peptidoglycane se trouve à l'extérieur de la membrane cytoplasmique; au microscope électronique, chez les Gram +, la paroi se présente sous forme d'une couche homogène de 15 à 50 nm d'épaisseur: le peptidoglycane en constitue 40 à 90 %. Chez les bactéries Gram -, la paroi présente un aspect lamellaire, avec une épaisseur de 20 à 30 nm, où l'on distingue en général deux ou trois couches, la couche la plus interne étant le peptidoglycane.

Le rôle essentiel joué par le peptidoglycane est démontré par l'éclatement en milieu hypotonique des protoplastes et sphéroplastes (bactéries privées soit complètement soit partiellement de leur paroi par l'action d'enzymes bactériolytiques, exemple lysozyme, ou d'antibiotiques, exemple pénicillines).

Le peptidoglycane est un hétéropolymère composé de chaînes de glycanes qui sont liées entre elles par de courtes chaînes peptidiques. Le glycane lui-même consiste en des chaînes linéaires où alternent des résidus pyranosides de N-acétylglucosamine et d'acide N-acylmuramique liés par des liaisons β-(1-4). Sur le carboxyle du groupe lactyle de l'acide muramique s'attache par une liaison amide la partie peptidique; ses unités peptidiques possèdent la séquence générale, L-R_1-D-R_2-L-R_3-D-Ala (voir figure 1).

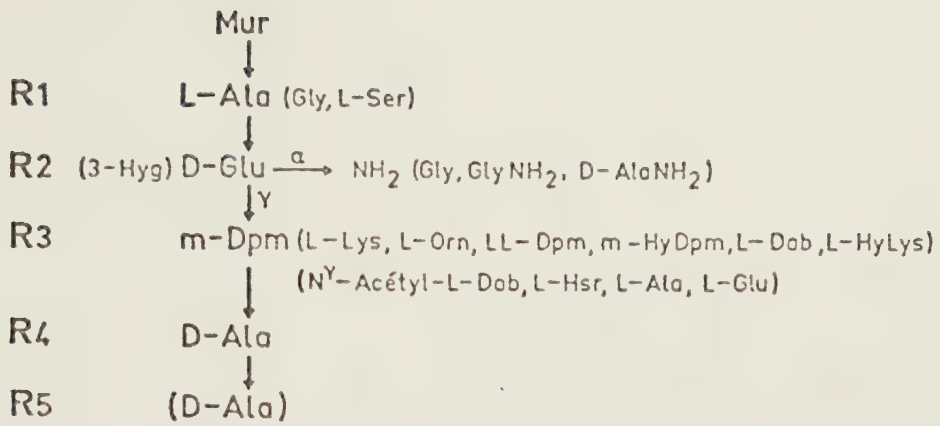


Figure 1 : Variations dans l'unité peptidique.
Les acides aminés dans les parenthèses peuvent se remplacer (d'après Schleifer et Kandler, 1972).

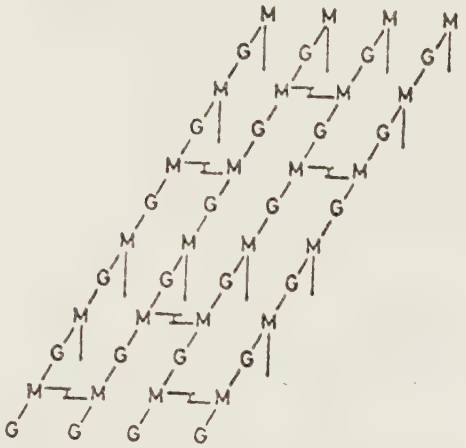
Des unités peptidiques adjacentes sont à leur tour liées l'une à l'autre soit par une liaison directe (figure 2-A) soit par un pont intermédiaire (figure 2-B), la liaison se faisant en général de la D-Ala C-terminale d'un tétrapeptide au groupe ω-aminé d'un autre résidu L-R3.

B - Biosynthèse du peptidoglycane.

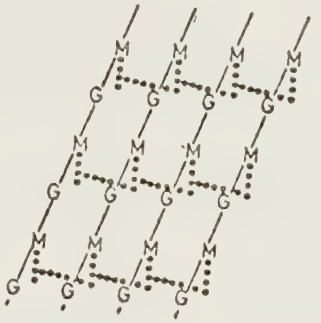
On peut diviser la biosynthèse du peptidoglycane en trois étapes d'après leur localisation (Strominger et al., 1967; Ghuysen et Shockman, 1973) : (a) synthèse des précurseurs uridine-nucléotides dans le cytoplasme, (b) transfert à la membrane et synthèse des unités disaccharides peptides par l'intermédiaire d'undécaprényl-phosphate, et (c) migration de ces unités vers les sites accepteurs de la paroi et formation des liaisons interpeptidiques qui achèvent le réseau insoluble de peptidoglycane exocellulaire (voir figure 3, et Tableau I).

Plusieurs variations structurales qui n'entraînent pas une modification importante dans la conformation fondamentale du peptidoglycane peuvent se rencontrer soit au niveau des sucres soit dans les chaînes peptidiques (figure 1) selon les systèmes bactériens étudiés.

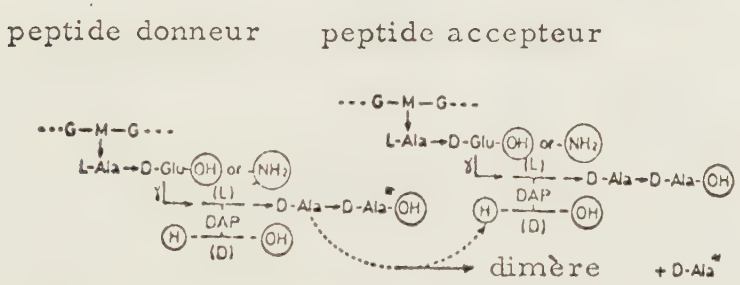
Il apparaît cependant que les variations les plus importantes concernent la nature de la liaison interpeptidique. On peut distinguer ainsi plusieurs chémotypes selon la composition en acides aminés et la localisation du pont interpeptidique (Ghuysen, 1968; Schleifer et Kandler, 1972; Schleifer, 1975). Cette division en chémotypes a une signification taxonomique.



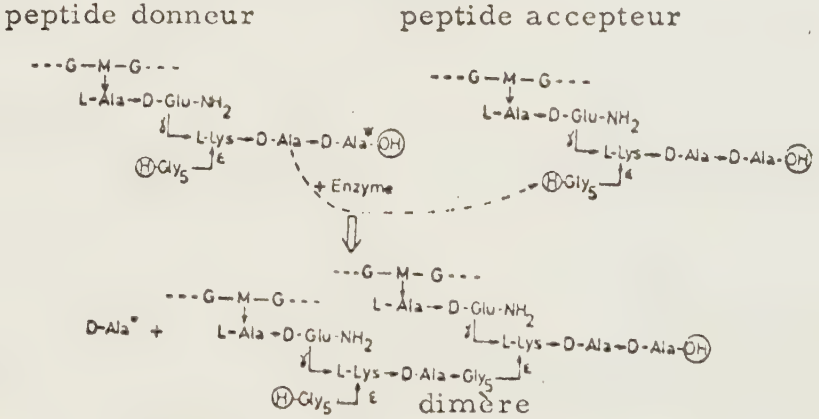
A - Peptidoglycane de E. coli.



B - Peptidoglycane de S. aureus.



C - Transpeptidation chez E. coli.



D - Transpeptidation chez S. aureus.

Figure 2 : Représentation schématique du réseau du peptidoglycane chez A, Escherichia coli et B, Staphylococcus aureus. Réaction de transpeptidation proposée pour C, E. coli et D, S. aureus (d'après Ghuysen et Shockman, 1973). Les chaînes de glycanes sont composées de N-acétylglucosamine (G) et d'acide N-acétylmuramique (M).

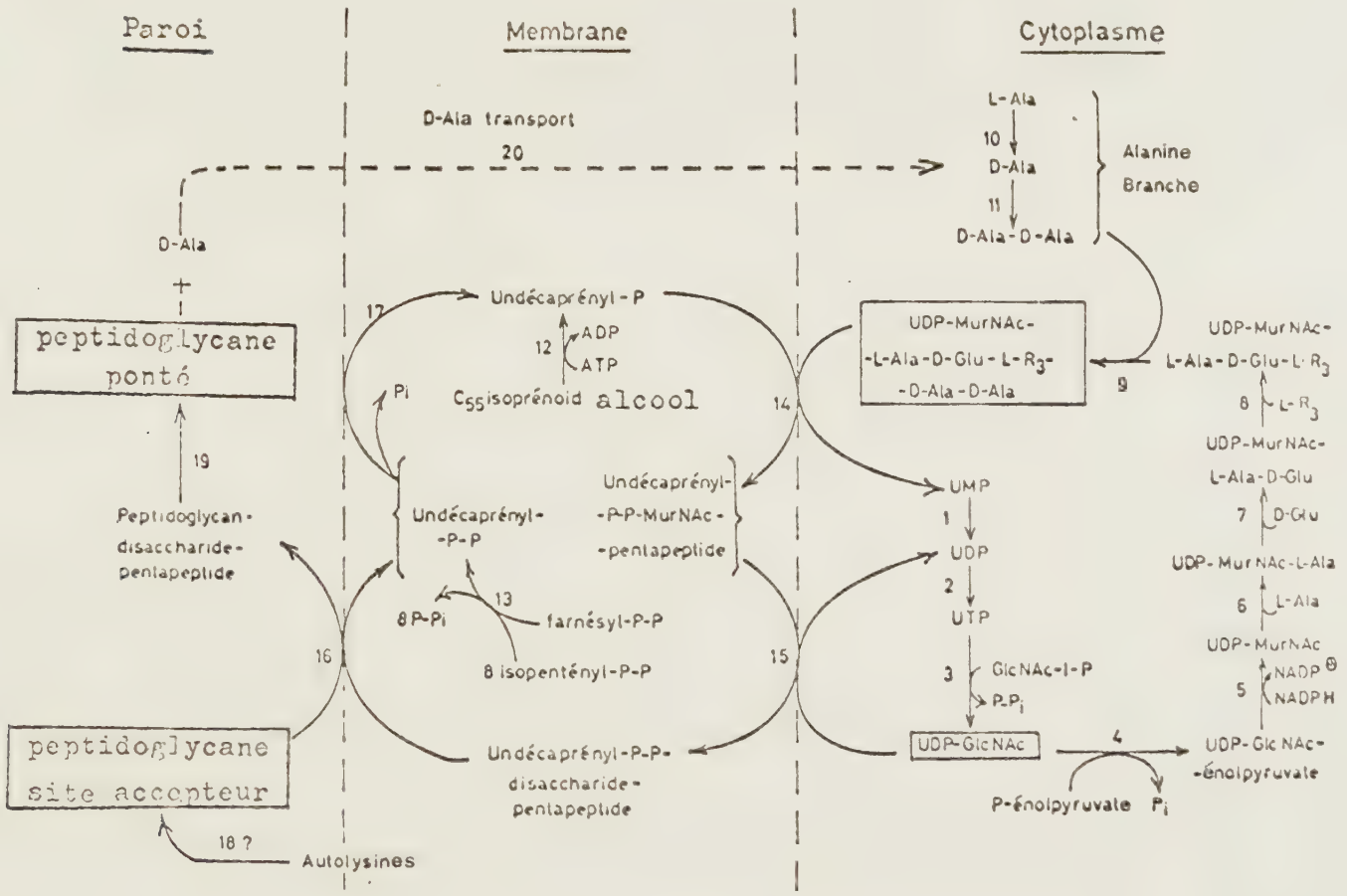


Figure 3 : Représentation schématique de la biosynthèse du peptidoglycane. Les réactions sont numérotées dans le sens anabolique (d'après Ghuysen et Shockman, 1973). Pour les enzymes intervenant dans la biosynthèse, voir le Tableau I.

Tableau I

Enzymes intervenant dans la biosynthèse du peptidoglycane.

Etape du schéma (figure 3)	Enzyme	Antibiotique inhibiteur
3	UDP-N-acétylglucosamine pyrophosphorylase	
4	Pyruvate : UDP-GlcNAc transférase	phosphonomycine
5	UDP-Glc-NAc-énolpyruvate réductase	
6, 7, 8	Enzymes d'addition d'acide aminé (L-Ala, D-Glu et R_3)	
9	Enzyme d'addition du D-Ala-D-Ala	
10	L-Ala : D-Ala racémase	D-cyclosérine
11	D-Ala : D-Ala ligase (ADP)	D-cyclosérine
12	Undécaprényl phosphokinase	
14	Phospho-MurNAc-pentapeptide translocase	vancomycine ristocétine
15	N-acétylglucosamine translocase	
16	Peptidoglycane synthétase	
17	Undécaprényl pyrophosphatase	bacitracine
18	Autolysine (endo-N-acétylmuramidase ?)	
19	Transpeptidase	pénicillines

C - Enzymes intervenant dans la formation de la liaison interpeptidique.

Une importance particulière est attachée à la transpeptidation car elle est l'étape finale de la biosynthèse du peptidoglycane donnant la rigidité à la paroi. De plus, cette transpeptidation s'est montrée la cible de l'action léthale de la pénicilline.

En fait, plusieurs activités enzymatiques, transpeptidasiques et carboxypeptidasiques, interviennent dans la synthèse et la régulation de la liaison interpeptidique .

(a) Les transpeptidases catalysent le transfert du résidu D-alanine pénultième d'un peptide donneur au groupe ω-aminé du résidu R_3 d'une autre chaîne jouant le rôle d'accepteur (figure 2-C, D). Pour chaque pont formé une quantité équivalente de D-Ala est libérée à partir du donneur pentapeptide. Cette transpeptidation n'a pas besoin d'un apport d'énergie exogène comme de l'ATP.

(b) Les D, D-carboxypeptidases, appelées aussi D-Ala carboxypeptidases I, catalysent la coupure d'un résidu D-Ala de la chaîne pentapeptidique soit dans le réseau de peptidoglycane, soit dans le précurseur uridine nucléotide pentapeptide, soit dans plusieurs autres substrats artificiels du type acyl-D-Ala-D-Ala. Comme le tétrapeptide résultant est incapable de servir de donneur dans la réaction de transpeptidation, un des rôles physiologiques de l'activité D, D-carboxypeptidasique pourrait être de contrôler le degré de pontage du réseau du peptidoglycane.

(c) Les L, D-carboxypeptidases, ou D-Ala carboxypeptidases II, catalysent l'hydrolyse de la liaison peptidique L-R_3-D-Ala qui est le produit de l'action antérieure des D, D-carboxypeptidases (Isaki et Strominger, 1968).

(d) En plus des enzymes déjà mentionnés, on a montré chez E. coli une activité endopeptidasique qui libère le dipeptide D-Ala-D-Ala à partir du précurseur UDP-MurNAc-pentapeptide (Gondré el al., 1973). On ignore la fonction physiologique de cet enzyme dans la biosynthèse du peptidoglycane.

Les transpeptidases et les carboxypeptidases sont inhibées par divers antibiotiques du type β-lactame. Le mécanisme précis d'action des pénicillines a été l'objet de nombreuses recherches, qui ont contribué largement à l'étude de ces enzymes.

D - La paroi des Mycobactéries.

La paroi des Mycobactéries, qui sont Gram + et acidorésistantes, se caractérise par l'association d'une série de glycolipides (mycoside, Cord factor, etc..) , peptidoglycolipide, glucane, et parfois glycosulpholipides. Des lipopeptides libres ont été remarqués par Kotani et al. (1970) et les travaux récents de Wietzerbin et al. (1973) ont montré la présence d'acide poly-(α)-L-glutamique dans certaines souches virulentes de Mycobactéries. Les acides teichoïques n'ont pas été isolés chez les Mycobactéries.

La structure basale de la paroi mycobactérienne est constituée de deux polymères liés covalemment; un peptidoglycane et un mycolate d'arabinogalactane (Lederer, 1971 ; Lederer et al., 1975). Ces polymères représentent environ 60 %(w/w) du poids de la paroi.

Dans toutes les Mycobactéries et les espèces voisines comme les Nocardiae, la chaîne de glycane contient de l'acide N-glycolylmuramique au lieu du dérivé usuel N-acétylé (Azuma et al., 1970). On ne le trouve pas chez les Corynebactéries et les Streptomyces.

L'unité tétrapeptidique L-Ala-γ-D-Glu-meso-A2pm-D-Ala ne diffère de celle trouvée chez E.coli que par la présence de deux groupes amidés sur l'acide glutamique et sur l'acide diaminopimélique (figure 4).

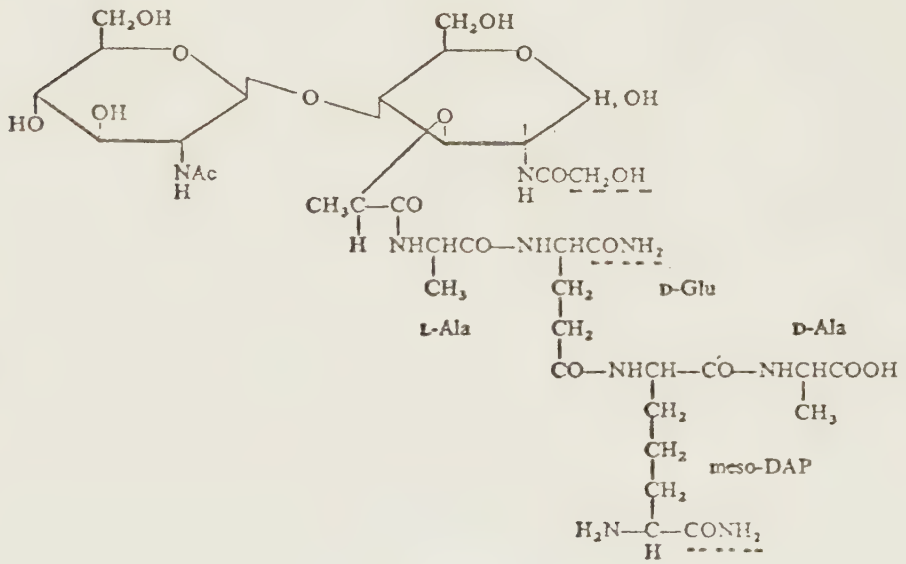


Figure 4: Structure de l'unité répétitive du peptidoglycane trouvé chez les Mycobactéries. Les substituants particuliers sont soulignés en pointillé (d'après Wietzerbin et al., 1970).

Quant aux liaisons interpeptidiques, Petit et al. (1969) ont montré chez M. smegmatis qu'elles sont directes entre deux monomères, i.e., D-Ala-meso-A_2pm. Récemment, un nouveau type de liaison, meso-A_2pm-meso-A_2pm, a été découvert chez M. smegmatis et chez M. tuberculosis BCG par Wietzerbin et al. (1974). Il intervient pour un tiers environ des liaisons interpeptidiques. La stéréoisomérie de cette nouvelle liaison n'est pas encore établie.

A partir de ces connaissances acquises sur la paroi mycobactérienne nous nous sommes intéressés à mettre en évidence et étudier des activités transpeptidasiques et carboxypeptidasiques qui interviendraient dans la formation des liaisons interpeptidiques non seulement "typiques" (R_4-R_3) mais aussi "atypiques" (R_3-R_3). Nos efforts ont porté sur l'identification des activités enzymatiques et sur leurs propriétés générales dans le Chapitre I, dans l'espoir que toutes ces données pourront servir dans le Chapitre II à élucider le mode d'interaction de la pénicilline avec les enzymes concernés.

CHAPITRE I

ETUDE GENERALE DES ENZYMES PARTICULAIRES

INTRODUCTION

Les premières études "enzymatiques" sur l'étape finale de la biosynthèse du peptidoglycane ont été effectuées avec les enzymes particulaires d'Escherichia coli en vue d'élucider le mécanisme d'action léthale de la pénicilline (Araki et al., 1966; Izaki et al., 1966). A mesure que des progrès ont été réalisés, la pénicilline, qui agit comme inhibiteur dans la biosynthèse du peptidoglycane, est devenue en même temps un moyen d'étudier les enzymes qui interviennent dans l'étape finale de la biosynthèse, à savoir les transpeptidases et carboxypeptidases responsables de la formation de la liaison interpeptidique et de sa régulation.

Les premières tentatives d'isolement des transpeptidases membranaires ont abouti à des échecs, car on ignorait le degré d'intégrité structurale requis pour que ces enzymes fonctionnent in vitro. Chez toutes les bactéries étudiées jusqu'à présent, les transpeptidases sont des enzymes membranaires.

Par contre, les carboxypeptidases présentent quelques diversités dans leur localisation. Les carboxypeptidases sont en général des enzymes membranaires. Mais on trouve chez E. coli les carboxypeptidases dans les deux fractions, solubles et particulaires (Izaki et Strominger, 1968). Les Streptomyces sp. ont la propriété remarquable de pouvoir excréter des D, D-carboxypeptidases dans le milieu de culture et elles ont été purifiées (Ghuysen et al., [a]1974). Ces D, D-carboxypeptidases exocellulaires sont également des transpeptidases, leur mode de fonctionnement dépendant des conditions expérimentales.

En ce qui concerne l'identité de toutes ces activités, il a été proposé que la D, D-carboxypeptidase soluble fonctionne comme transpeptidase lorsqu'elle est intégrée dans la membrane (Lawrence et Strominger, 1970; Leyh-Bouille et al., 1970). Il faut noter que les transpeptidases membranaires de E coli (Pollock et al., 1974) et de Streptomyces R 61 (Ghuysen et al., [a]1974) présentent une activité D, D-carboxypeptidasique lorsqu'elles sont solubilisées soit par des détergents, exemple Brij 36 T, soit par l'urée.

Dans cette hypothèse représentée par la figure 5 , une D, D-carboxypeptidase qui ne fonctionne apparemment que comme hydrolase, par exemple la D, D-carboxypeptidase exocellulaire de Streptomyces albus G, serait une "transpeptidase découplée", c'est-à-dire , une transpeptidase qui ne possède pas le site de fixation de l'accepteur.

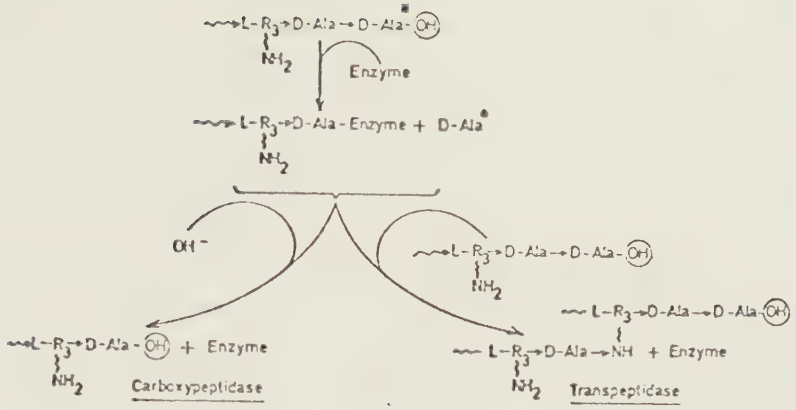


Figure 5 : Mécanisme possible d'hydrolyse et de transpeptidation par des "D, D-carboxypeptidase-transpeptidases" (d'après Ghuysen et Shockman, 1973).

Un autre argument en faveur de l'hypothèse ci-dessus est apporté par le fait que des D, D-carboxypeptidases purifiées de Bacillus stearothermophilus (Yocum et al., 1974) et d'E. coli (Strominger et al., 1974) possèdent des activités multiples telles que transpeptidasique et endopeptidasique (Bogdanovsky et al., 1969).

Néanmoins, beaucoup d'enzymes sont connus pour une seule de ces activités: soit carboxypeptidasique soit transpeptidasique, soit endopeptidasique avec une différence nette de spécificité envers le substrat et de sensibilité aux pénicillines. Dans ce contexte, on s'aperçoit qu'il est difficile d'attribuer une identité absolue et unique à une activité enzymatique mesurée.

Nous présentons dans ce Chapitre I les résultats d'études menées avec des enzymes particulaires sur: (a) la mise en évidence des activités enzymatiques, (b) la recherche de conditions optimales pour la D, D-carboxypeptidase, (c) la solubilisation de la D, D-carboxypeptidase par des détergents non-ioniques, (d) la détermination de certaines constantes enzymatiques de la D, D-carboxypeptidase sous forme d'enzymes particulaires et sous forme d'enzymes solubilisés, et (e) la comparaison des influences de la conservation sur les paramètres cinétiques.

I - CULTURE DES MICROORGANISMES.

Les microorganismes employés pour la préparation des enzymes particulaires et pour la préparation des substrats sont Mycobacterium smegmatis ATCC 21732 et Mycobacterium phlei ATCC 356. Ce sont des souches non-pathogènes de Mycobactéries ayant un temps de génération relativement court (3 h. - 3 h.30).

La culture de ces bactéries se déroule à 37° sur des tubes de milieu de Jensen; ces tubes servent à ensemencer la culture qui se fait dans le milieu de Brodie (voir Méthodes bactériologiques) dans des Erlens de 2 litres contenant chacun 800 ml de milieu et placés à 37° dans un incubateur New Brunswick Giratory Shaker opérant à la vitesse de 150 rev./min.

La croissance des bactéries est suivie par la mesure de la densité optique à 550 nm au Spectrophotomètre Zeiss PMQ II. Les cellules sont récoltées aux 2/3 de la phase exponentielle de croissance par centrifugation à 10.000 g x 20 min. (Sorvall RC 2-B). La courbe de croissance est donnée dans la figure 6.

Les cellules sont lavées par remise en suspension dans 50 fois leur volume d'acétate d'ammonium 40 mM, pH 7,0 suivie d'une centrifugation à la même vitesse que précédemment. Les cellules ainsi obtenues (2 g poids frais/litre) sont conservées à -20°.

II - PREPARATION DES ENZYMES PARTICULAIRES.

Les méthodes classiques utilisées pour obtenir des fragments membranaires de bactéries (des protoplastes ou sphéroplastes obtenus par l'action du lysozyme sont soumis à un choc osmotique) ne sont pas applicables dans le cas des Mycobactéries. Il était donc nécessaire d'utiliser un moyen de broyage mécanique, et après quelques essais préliminaires avec la presse de French, nous avons choisi le broyage à l'alumine selon la technique décrite par Izaki et al. (1968).

Les cellules sont broyées pendant 10 minutes dans un mortier refroidi avec 3 fois leur poids d'alumine. Toutes les opérations sont effectuées à 0-4°.

Après broyage le mélange bactéries-alumine est mis en suspension dans 10 volumes de tampon Tris-HCl 20 mM, pH 7,5 contenant du $MgCl_2$ 10 mM, puis centrifugé 2 fois à 3.000 g x 10 min. pour éliminer l'alumine et les cellules intactes. Les centrifugations différentielles se poursuivent à 10.800 g x 60 min. (Sorvall RC 2-B, Rotor SS34) afin d'éliminer les parois et enfin à 65.000 g x 60 min. (Beckman Spinco, Rotor Ti60) pour obtenir la fraction membranaire. Les culots sont alors

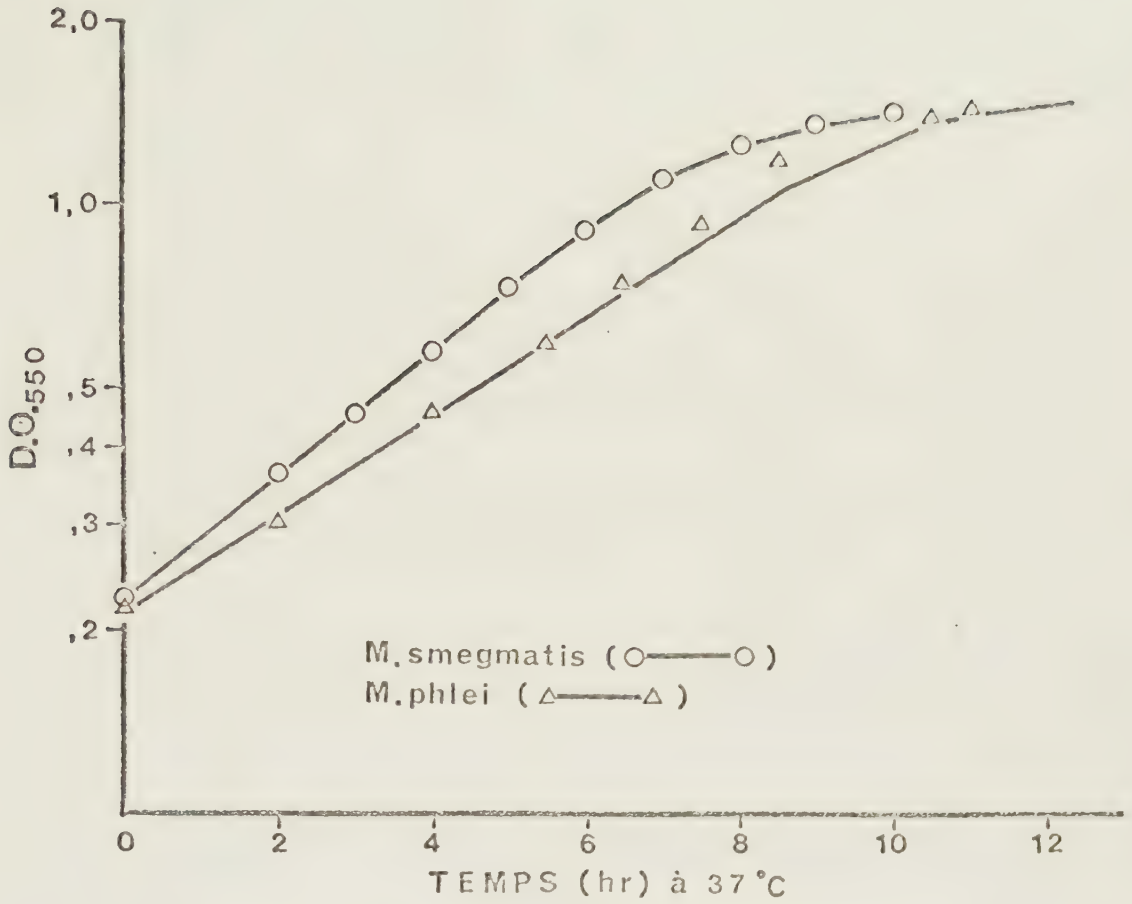


Figure 6 : Courbes de croissance des Mycobactéries.
Voir le texte pour les conditions de culture.

lavés par remise en suspension dans 50 fois leur volume de tampon cacodylate-HCl 20 mM, pH 6, 1, puis centrifugés à 65.000 g x 60 min.

Le culot résultant est homogénéisé dans le même tampon cacodylate-HCl 20 mM, pH 6, 1 à une concentration en protéine de l'ordre de 10 à 20 mg/ml. Le rendement est d'environ 50 mg par g de cellules (poids frais). La concentration en protéines est déterminée comme décrit dans les Méthodes Analytiques du Chapitre III. Les préparations d'enzymes particulaires sont conservées à -20° par fractions de 0, 5 ml.

III - ACTIVITES ENZYMATIQUES DES ENZYMES PARTICULAIRES.

Nous avons mis en évidence dans les enzymes particulaires deux activités carboxypeptidasiques se manifestant sur le principal substrat utilisé, l'UDP-MurNglyc-L-Ala-γ-D-Glu-meso-A_2pm-D-(^{14}C)Ala-D-(^{14}C)Ala. Nous n'y avons pas rencontré l'activité peptidasique libérant le dipeptide D-alanyl-D-alanine décrite par Gondré et al. (1973) chez E. coli K 12.

1- Distribution de l'activité D, D-carboxypeptidasique.

Nous avons recherché cette activité éventuellement exocellulaire dans le filtrat de culture. Nous avons ajouté à 15 litres de filtrat 5 ml de gel de phosphate de calcium par fractions, et ensuite nous les avons élués par 10 ml de tampon phosphate 0,2 M, pH 6,9.

Nous n'avons détecté aucune activité D, D-carboxypeptidasique dans cet éluat concentré 4 fois sur carbowax 20.000 et dialysé contre un tampon Tris-HCl 20 mM, pH 7,5.

Au cours de la préparation des enzymes particulaires, nous avons retrouvé dans le surnageant de la dernière centrifugation 10 % de l'activité D, D-carboxypeptidasique. Les protéines dans le surnageant avaient été fractionnées par précipitation entre 30 et 70 % de saturation en sulfate d'ammonium.

2- Activité D, D-carboxypeptidasique en fonction du temps d'incubation.

Dans les conditions décrites dans la légende de la figure 7, la libération de D-(^{14}C) alanine terminale à partir du substrat UDP-MurNglyc-L-Ala-γ-D-Glu-meso-A_2pm-D-(^{14}C)Ala-D-(^{14}C)Ala est parfaitement linéaire jusqu'à une heure d'incubation à 30°C aboutissant à une libération d'environ 8% de D-(^{14}C)Ala terminale. La libération décroît de 5% par rapport à la vitesse initiale pendant la deuxième heure d'incubation. Si l'on continue l'incubation durant 94 heures, on observe la libération de 38% de la D-(^{14}C)Ala pénultième à partir du substrat. Ce fait démontre la présence d'une activité L, D-carboxypeptidasique (ou D-Ala carboxypeptidase II) dans les enzymes particulaires de M. smegmatis.

Cependant cette activité est faible dans les conditions optimales pour la manifestation de l'activité D, D-carboxypeptidasique, comme nous l'avons vérifié en utilisant le substrat N-glycolylmuramyl-(^{14}C) tétrapeptide avec lequel nous n'avons constaté aucune libération de D-(^{14}C)Ala en deux heures d'incubation.

3- Activité D, D-carboxypeptidasique en fonction de la concentration en protéines des enzymes particulaires.

Les essais ont été effectués selon la méthode standard (voir Méthodes analytiques) en fonction de la concentration des enzymes particulaires

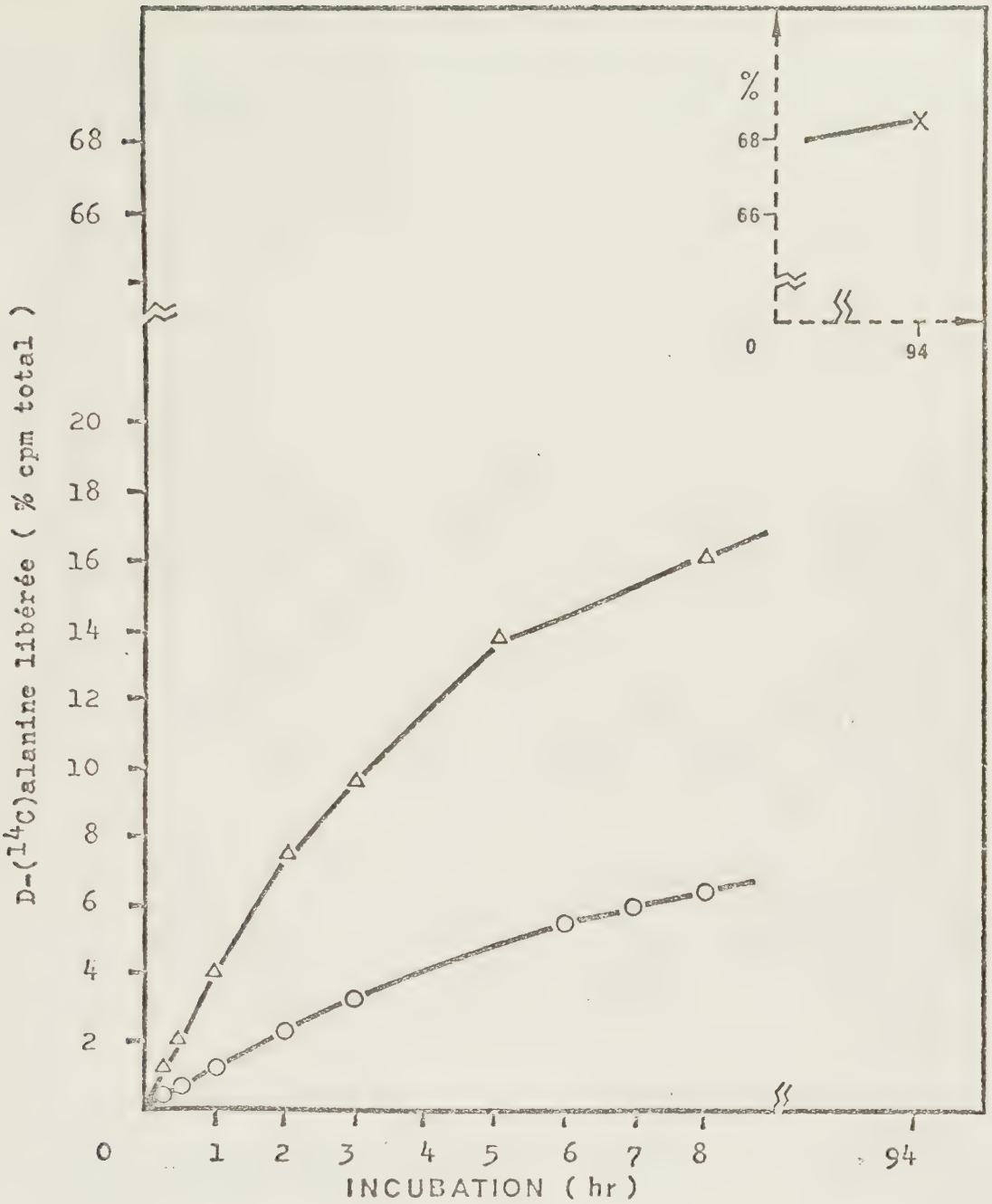


Figure 7 : Activité D, D-carboxypeptidasique en fonction du temps d'incubation. L'incubation a été effectuée à 30° avec 85 µg (o — o) et 170 µg (∆ — ∆) de protéines membranaires par aliquote (25 µl) d'enzymes particulaires frais. Les aliquotes sont prélevées à différents intervalles de temps à partir du mélange réactionnel contenant dans 250 µl: UDP-MurNglyc-(^{14}C)pentapeptide ($3,31 \times 10^4$ cpm/25 µl aliquote) 1,46 mM, $MgCl_2$ 10 mM, Triton X-100 1 %, et sodium cacodylate-HCl 10 mM, pH 6,1.
Dans l'encadré est présentée la libération de D-(^{14}C)alanine après une incubation de 94 h. d'UDP-MurNglyc-(^{14}C)pentapeptide 1,60 mM avec 360 µg de protéine dans un volume final de 50 µl. L'activité enzymatique est exprimée en % des cpm de D-(^{14}C)alanine libérée par rapport au nombre de cpm total des substrats.

frais (figure 8) .Par la suite, nous avons travaillé avec 80 µg à 400 µg de protéines.

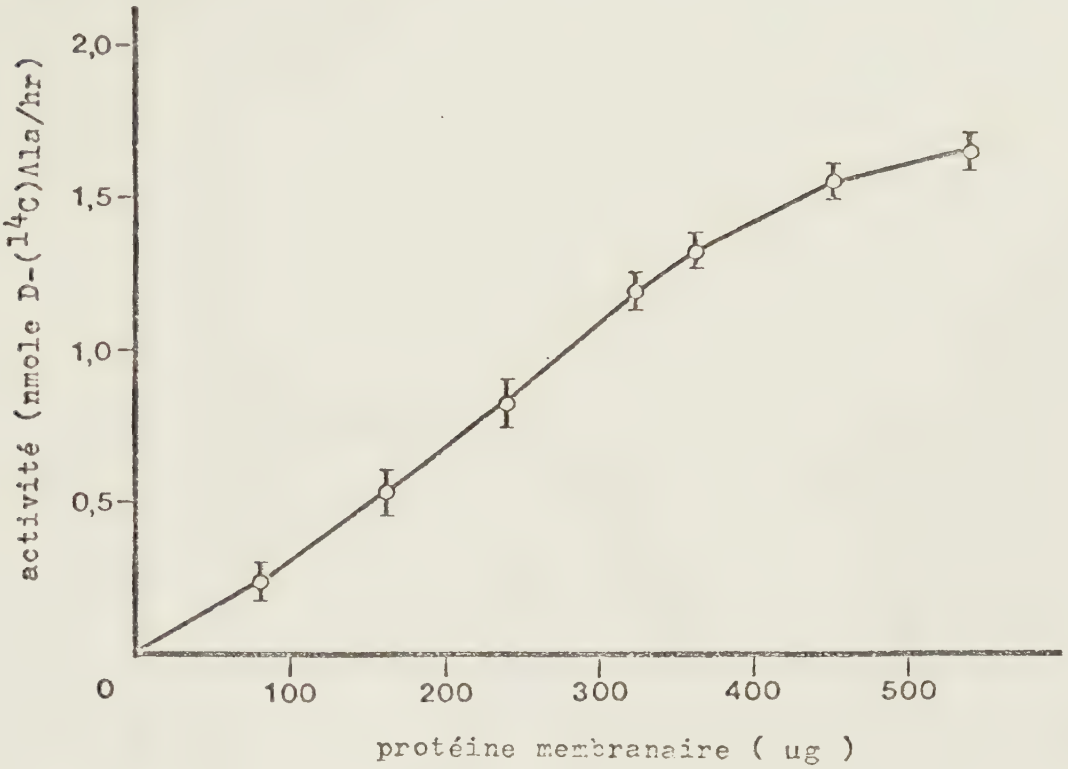


Figure 8 : Activité D, D-carboxypeptidasique en fonction de la concentration en protéines des enzymes particulaires. Les enzymes particulaires de M. smegmatis sont homogénéisés dans le tampon sodium cacodylate-HCl 20 mM, pH 6, 1 (voir préparation des enzymes particulaires).

4- Mise au point des conditions d'incubation.

Les conditions optimales ont été déterminées en faisant varier les différents facteurs qui interviennent dans l'incubation.

4-1 pH optimal de l'activité D, D-carboxypeptidasique:

La figure 9 montre qu'en tampon cacodylate-HCl 20 mM, le pH optimal est de 6, 1.

4-2 Influence de la force ionique:

A pH 6, 1, la concentration optimale en tampon cacodylate-HCl a été recherchée; comme le montre la figure 10, cette concentration est de 20 mM.

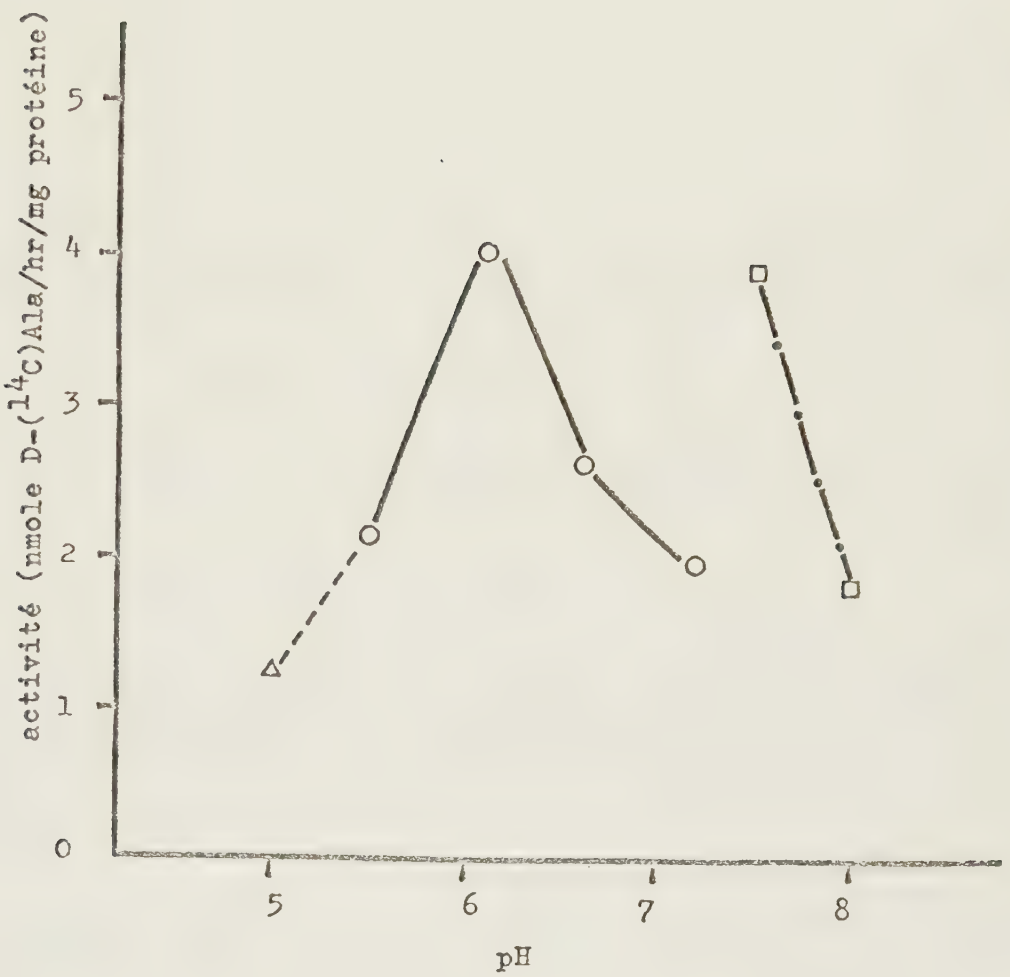


Figure 9 : Détermination du pH optimal de l'activité D, D-carboxypeptidasique. Les enzymes particulaires frais ont été lavés une fois et remis en suspension dans les tampons 20 mM suivants: sodium acétate pH 5, 0 (△), sodium cacodylate-HCl, pH 5, 5, 6, 1, 6, 6 et 7, 2 (O), Tris-HCl, pH 7, 5 et 8, 0 (□).
Le mélange réactionnel contient dans un volume final de 50 µl l'UDP-MurNglyc-(14C)pentapeptide 0, 52 mM, $MgCl_2$ 10 mM, Triton X-100 0, 5 % , le tampon 20 mM et 315 µg de protéines. L'incubation est faite à 30° pendant une heure.

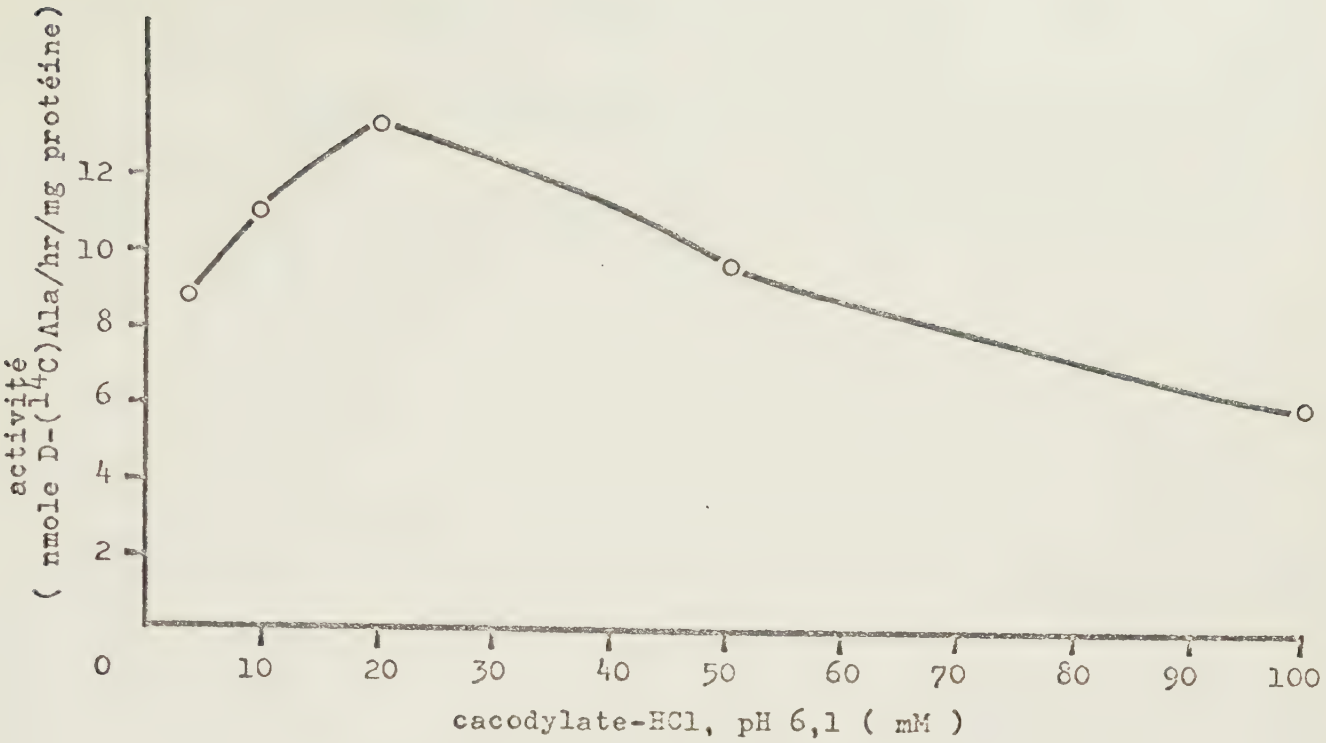


Figure 10 : Détermination de la concentration optimale du tampon sodium cacodylate-HCl, pH 6, 1.

4-3 Effets des cations divalents :

L'activité D, D-carboxypeptidasique s'accroît rapidement jusqu'à 10 mM en $MgCl_2$ et après cela se stabilise (figure 11) , néanmoins nous voyons que l'adjonction de $MgCl_2$ n'est pas indispensable à l'activité enzymatique. La présence d'EDTA 2 mM introduit une diminution de 20 % de l'activité à une concentration nulle de cations divalents.

$ZnSO_4$ 1 mM s'est montré 2 fois plus actif que $MgCl_2$ à la même concentration. Cependant nous avons choisi l'ion Mg^{2+} car, d'après Florey (1949), la pénicilline G est instable en présence d'ion Zn^{2+}.

4-4 Recherche de la température optimale:

La figure 12 montre que la température optimale de la D, D-carboxypeptidase en présence de Triton X-100 est de 30°.

4-5 Effets des détergents non-ioniques:

L'activité D, D-carboxypeptidasique des enzymes particulaires est augmentée 2, 5 fois environ en présence de 0, 5 à 1 % (v/v) de détergents non-ioniques tels que le Triton X-100 et le Genapol X-100 (figure 13) . Pour la plupart des essais, nous avons travaillé en présence de 0, 5 % de Triton X-100.

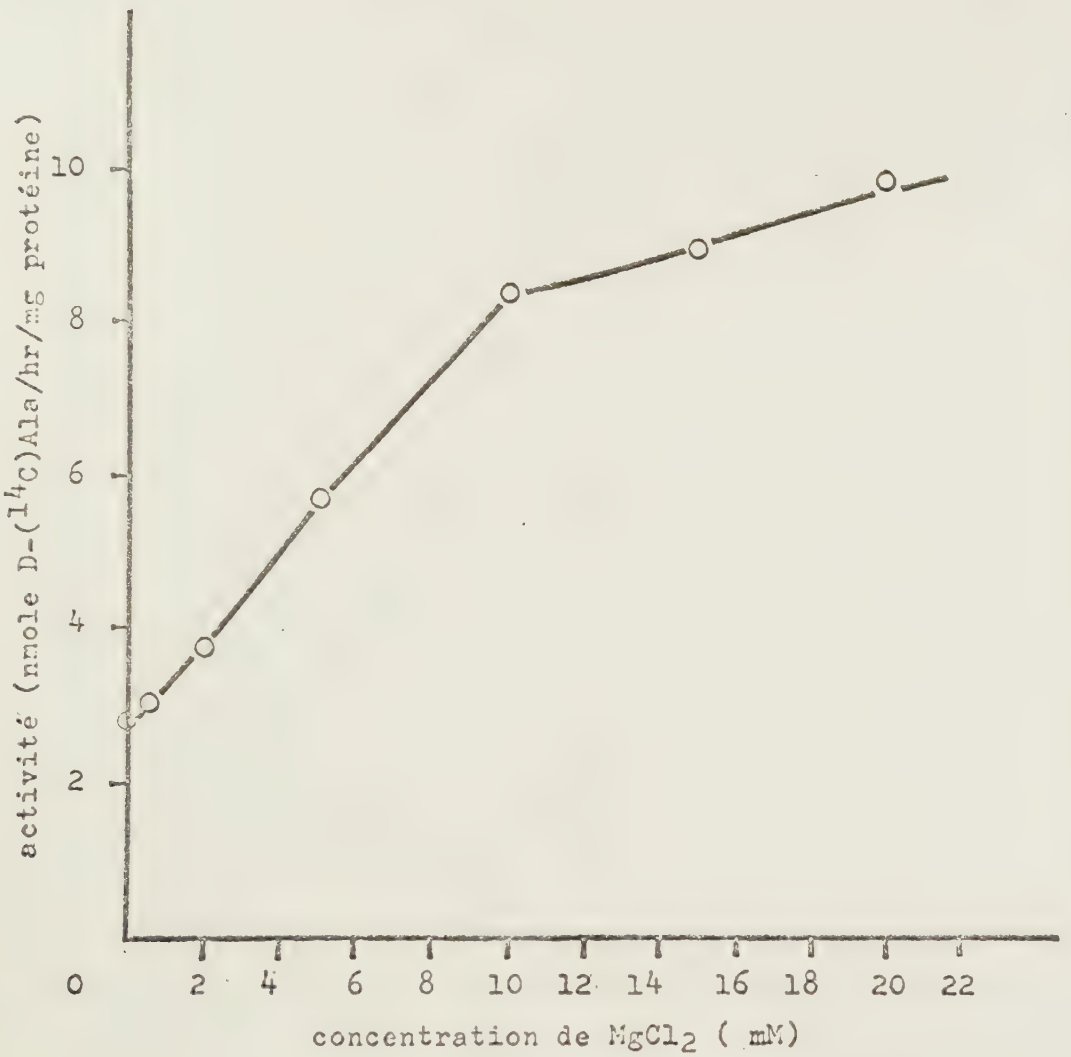


Figure 11 : Détermination de la concentration optimale de Mg^{2+}.

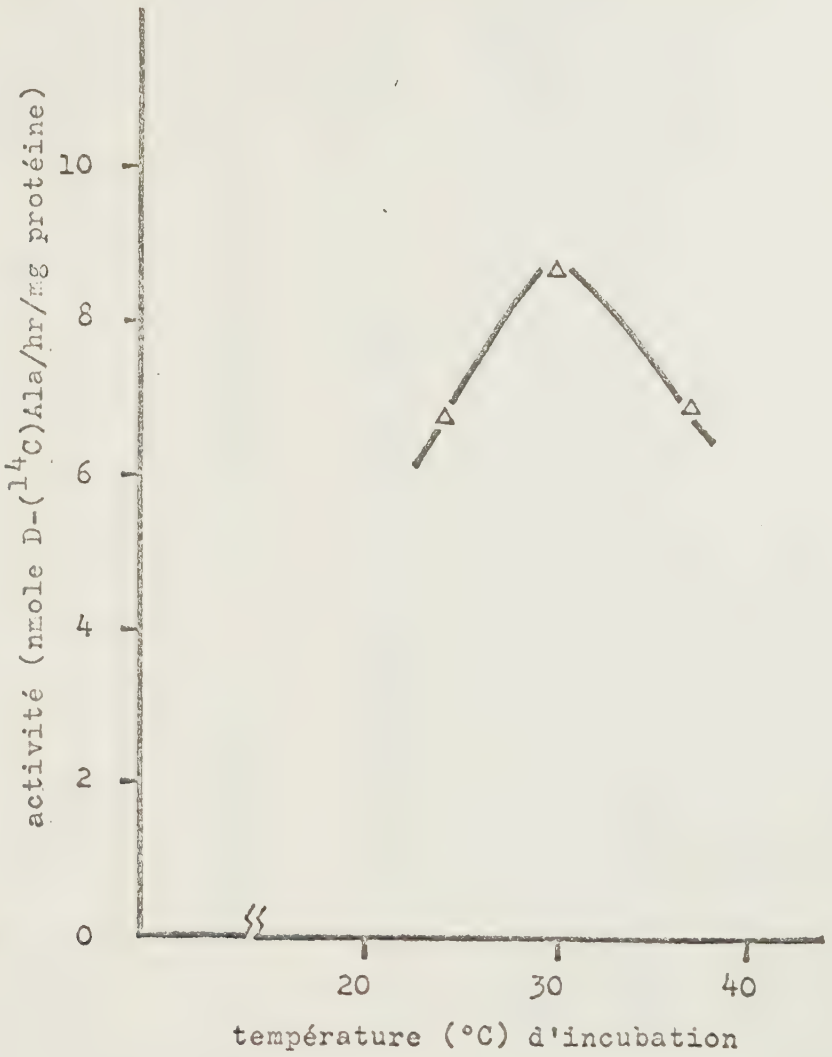


Figure 12 : Détermination de la température optimale d'incubation.

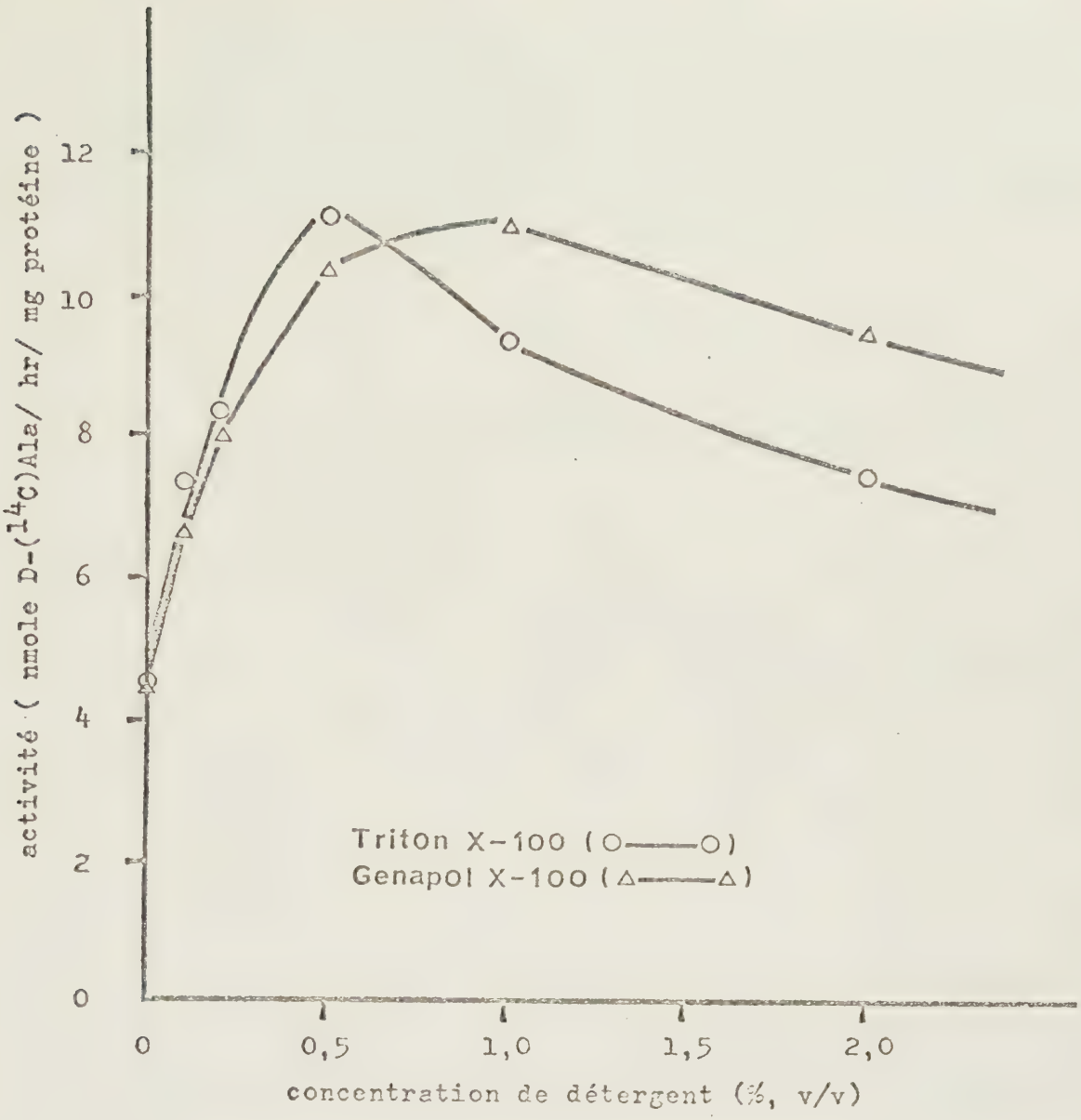


Figure 13 : Influence des détergents non-ioniques sur l'activité D, D-carboxypeptidasique.

5- Solubilisation de l'activité D, D-carboxypeptidasique membranaire par des détergents non-ioniques.

Afin de pouvoir étudier les propriétés de l'activité D, D-carboxypeptidasique en présence de moins de protéines membranaires contaminantes et en vue de la purification de l'enzyme, nous avons tenté de solubiliser l'activité D, D-carboxypeptidasique à partir des fragments membranaires à l'aide de deux sortes de détergents non-ioniques, le Triton X-100 et le Genapol X-100.

Les enzymes particulaires sont additionnés de détergent à 1 % (v/v) de concentration, puis agités pendant une heure à 0-4° par agitateur magnétique et soumis à une centrifugation à 80.000 g x 1 h. (Beckman Spinco, Rotor 65). Les enzymes présents dans le surnageant seront appelés "enzymes solubilisés" et les enzymes dans le culot seront appelés "enzymes résiduels" (voir Tableau II).

Tableau II

Comparaison de la solubilisation de l'activité D, D-carboxypeptidasique à partir des enzymes particulaires par des détergents non-ioniques.

Détergent	Concentration finale (%)	Solubilisation		Spécificité (Activité enzymatique / Protéine totale)
		Protéine totale (%)	Activité enzymatique (%)	
Triton X-100	1	45	70	1,56
Genapol X-100	1	38	48	1,26
Genapol X-100 (2ème traitement)	1	19	24	1,26

Ces résultats nous ont conduit à utiliser le Triton X-100 pour étudier les propriétés de la D, D-carboxypeptidase sous forme d'enzymes particulaires et solubilisés. Afin de poursuivre la purification de l'enzyme nous avons eu recours au Genapol X-100 (voir la Discussion).

6- Détermination des constantes enzymatiques; Km et V.

Les constantes enzymatiques, Km et V, sont obtenues par la méthode de Lineweaver et Burk (1934) en utilisant l'UDP-MurNglyc-L-Ala-γ-D-Glu-meso-A_2pm-D-(^{14}C)Ala-D-(^{14}C)Ala comme substrat.

L'activité D, D-carboxypeptidasique est mesurée dans la limite de 15 % de libération de la D-(^{14}C)alanine terminale. Nous considérons donc que cette activité enzymatique est mesurée sur la base de la vitesse initiale avant que la disparition du substrat ne modifie la vitesse de la réaction. Les essais d'activité D, D-carboxypeptidasique des enzymes particulaires et des enzymes solubilisés sont effectués en présence de Triton X-100 comme décrit dans l'essai standard.

Les constantes cinétiques, obtenues à partir de la figure 14, avec une préparation fraîche d'enzymes, sont les suivantes: Km = 16,7 mM, V = 250 nmole/h./mg protéine. Les constantes sont les mêmes pour les enzymes particulaires et les enzymes solubilisés. Notons que les deux essais sont effectués en présence de 0,5 % de Triton X-100, ce qui explique sans doute le résultat obtenu.

7- Effets de la conservation.

7-1 Stabilité des enzymes solubilisés à la température ordinaire:

Les résultats, présentés dans le Tableau III, nous montrent que l'activité D,D-carboxypeptidasique des enzymes solubilisés est assez stable à la température du laboratoire.

Tableau III

Stabilité de l'activité D,D-carboxypeptidasique à 21°. Les enzymes solubilisés à partir d'enzymes particulaires frais par traitement avec le Triton X-100 à 1 % ont été préincubés à 21°. Des aliquotes de 25 µl (=120 µg en protéines) ont été prises à divers intervalles de temps pour tester l'activité D,D-carboxypeptidasique comme décrit dans l'essai standard.

Temps de préincubation (h.)	Activité spécifique (nmole D-(^{14}C)Ala/h./mg protéine)	Activité relative (%)
0	22,5	100
2	22,2	99
6	20,5	91
14	20,0	89
24	18,5	82

7-2 Conservation à -20°:

a) Influence sur l'activité D,D-carboxypeptidasique:

Les enzymes sont conservés à -20° soit sous forme d'enzymes particulaires, soit sous forme d'enzymes solubilisés,et l'activité D,D-carboxypeptidasique est mesurée au cours de la conservation. Le Tableau IV montre que les enzymes solubilisés perdent leur activité D,D-carboxypeptidasique beaucoup plus vite que les enzymes particulaires.

Tableau IV

Influence de la conservation à -20° sur l'activité D, D-carboxypeptidasique. Les enzymes particulaires frais homogénéisés dans le tampon cacodylate-HCl 20 mM, pH 6, 1 sont conservés à -20° par petites fractions pour que l'activité D, D-carboxypeptidasique soit testée sur une préparation qui n'a subi qu'une fois la congélation et décongélation. Les enzymes solubilisés provenant du même lot d'enzymes particulaires frais sont soumis à des conditions identiques de conservation et d'essai de l'activité D, D-carboxypeptidasique.

Temps de conservation (semaine)	Activité D, D-carboxypeptidasique par rapport au témoin (%)	
	Enzymes particulaires	Enzymes solubilisés
0 (frais)	100	100
2	100	75
6	82	60
12	75	-

b) Influence sur des constantes cinétiques:

A la suite des études qui viennent de nous montrer que la perte d'activité D, D-carboxypeptidasique dépend de l'état dans lequel les enzymes ont subi la conservation, nous avons été conduits à étudier l'influence éventuelle de la conservation à -20° sur les constantes cinétiques.

Les paramètres cinétiques d'activité D, D-carboxypeptidasique s'étant montrés subir une petite variation d'une préparation d'enzymes à l'autre une comparaison des paramètres ne sera par conséquent valable qu'avec un même lot d'enzymes. L'efficacité enzymatique, définie comme V divisée par Km (Pollock, 1965), est employée et cette définition exprime l'efficacité fonctionnelle des enzymes dans les conditions de faible saturation par leurs substrats. Les résultats d'analyses, représentés également par la figure 14, sont résumés dans le Tableau V.

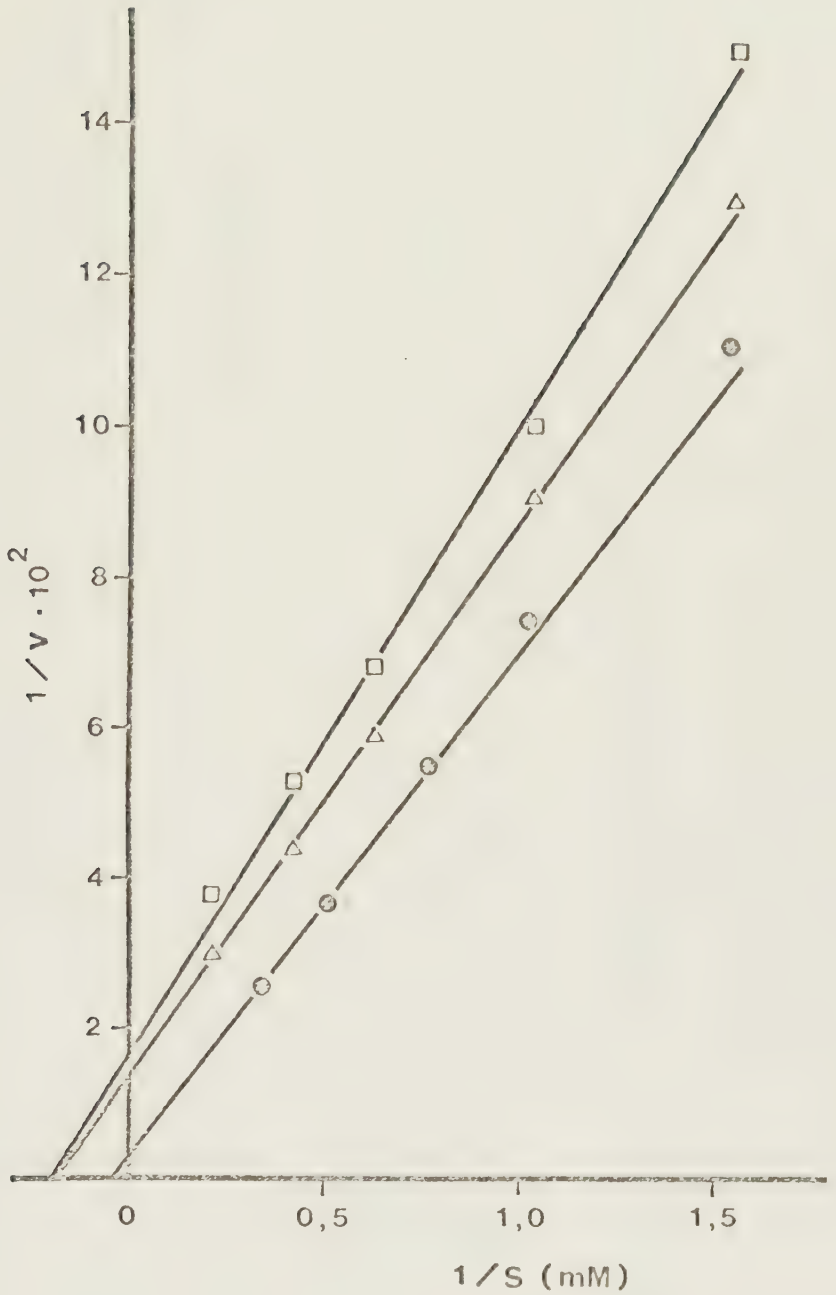


Figure 14 : Détermination du Km et V par la représentation de Lineweaver et Burk. (● — ●) , enzymes frais sous forme particulaire et solubilisée. Enzymes conservés à -20° pendant 6 semaines sous forme d'enzymes particulaires (△—△) sous forme d'enzymes solubilisés (□—□). Voir essai standard pour les conditions d'incubation. v = nmole D-(^{14}C)Ala/h./mg protéine.

Tableau V

Constantes enzymatiques des enzymes frais et des enzymes conservés à -20° pendant 6 semaines.

Enzyme (conservation)	Km (mM)	V(nmole D-(^{14}C)Ala/ h./mg protéine)	Efficacité enzymatique (V/Km)	Perte d'efficacité (%)
Frais	16,7	250	15,0	0
Particulaires (6 semaines)	5,1	69,2	13,5	10
Solubilisés (6 semaines)	5,1	61,0	12,0	20

Nous voyons que la conservation à -20° pendant 6 semaines a induit une parte d'efficacité enzymatique de 10 % pour les enzymes particulaires et de 20 % pour les enzymes solubilisés.

DISCUSSION

1 - Activité enzymatique des enzymes particulaires.

Les fragments membranaires de M. smegmatis ont montré deux activités: D, D-carboxypeptidasique et L, D-carboxypeptidasique.

Dans les conditions d'essai employées, l'activité peptidasique libérant la D-alanyl-D-alanine, une activité présente dans le système de E. coli (Gondré et al., 1973) n'a pas pu être mise en évidence.

L'activité transpeptidasique éventuelle a été brièvement recherchée avec les substrats suivants: UDP-MurNglyc-(^{14}C)pentapeptide, MurNglyc-(^{14}C)pentapeptide et MurNglyc-(^{14}C)tétrapeptide comme donneurs probables avec des accepteurs probables de transpeptidation tels que la D-alanine et l'acide meso-diaminopimélique. Les résultats obtenus jusqu'à présent ne sont pas positifs dans les conditions qui ont permis d'étudier l'activité D, D-carboxypeptidasique.

Cependant, nous avons remarqué que l'activité D-D-carboxypeptidasique à pH 7, 5 des enzymes particulaires de M. smegmatis est inhibée de 30 % en présence d'une forte concentration d'acide meso-diaminopimélique (10 fois celle du substrat donneur, MurNglyc-(^{14}C) pentapeptide). L'étude approfondie de ce phénomène d'inhibition de l'activité D, D-carboxypeptidasique par l'accepteur éventuel de transpeptidation n'a pas été poursuivie. Il est vraisemblable que l'activité D, D-carboxypeptidasique de M. smegmatis fonctionne dans certains cas comme transpeptidase synthétisant alors la liaison interpeptidique D-Ala-(D)-meso-A_2pm, si on prend l'exemple de la D, D-carboxypeptidase-transpeptidase soluble de Streptomyces R 39 (Ghuysen et al. ^{b}1974; Pollock et al., 1972).

De même, nous avons commencé l'étude de l'activité L, D-carboxypeptidasique de M. smegmatis, car la possibilité pour cet enzyme de fonctionner dans certains cas favorables comme transpeptidase conférerait une explication de ce que l'on trouve en fait le produit de la transpeptidation "atypique", meso-A_2pm-meso-A_2pm, dans le réseau du peptidoglycane chez les Mycobactéries.

L'activité L, D-transpeptidasique membranaire a été étudiée chez Streptococcus faecalis où la majeure partie des liaisons interpeptidiques se fait par l'intermédiaire d'un résidu D-isoasparaginyl entre la D-alanine terminale d'une chaîne tétrapeptidique et la N^{ϵ}-L-lysine d'une autre chaîne (Coyette et al., 1974). Il faut cependant noter que l'on n'a

pas encore trouvé dans le réseau du peptidoglycane de S. faecalis le produit de la transpeptidation qui serait catalysée par cette activité.

L'importance liée à la sensibilité de tous ces enzymes aux divers antibiotiques sera l'objet de la Discussion du Chapitre II.

2- Effets de détergents non-ioniques.

Nous avons remarqué que la présence d'une concentration de 0,5 % à 1 % d'un détergent non-ionique, soit le Triton X-100 soit le Genapol X-100, augmente de 2,5 fois l'activité D, D-carboxypeptidasique des enzymes particulaires.

L'étude systématique des détergents, effectuée par Yocum et al. (1974), conduit à la même valeur d'activation maximale pour l'activité D, D-carboxypeptidasique chez Bacillus stearothermophilus.

Le pouvoir de solubilisation spécifique de l'activité D, D-carboxypeptidasique membranaire est 1,2 fois plus grand pour le Triton X-100 que pour le Genapol X-100. De plus, le Triton X-100 se montre 1,2 fois plus efficace pour extraire des protéines totales à partir des fragments membranaires. Le traitement répétitif avec le Genapol X-100 s'effectue toujours avec la même valeur de solubilisation spécifique de l'activité D, D-carboxypeptidasique. Nous n'avons pas fait cette étude avec le Triton X-100.

L'interaction spécifique du Triton X-100 avec les enzymes est connue depuis longtemps. Barnett (1973) décrit une stimulation exceptionnelle de 12 fois de l'activité D, D-carboxypeptidasique chez B. stearothermophilus. Umbreit et Strominger ([a]1973) fournissent des arguments concrets de l'interaction Triton X-100-enzyme: au cours de la purification de la D, D-carboxypeptidase de Bacillus subtilis, le complexe détergent-enzyme se comporte comme une entité moléculaire et se présente sous forme de micelles constituées de 3 moles de protéine et de 300 moles de détergent. Malgré tout, Diaz-Maurino et al. (1974) ont conclu avec le système D, D-carboxypeptidasique de Bacillus megaterium que la spécificité de l'enzyme envers des substrats et des inhibiteurs est intrinsèque et non influencée par la solubilisation.

Nous avons pu démontrer que l'activité D, D-carboxypeptidasique des enzymes particulaires de M. smegmatis présente des Km, V et Ki identiques à ceux des enzymes solubilisés, lorsque l'analyse est effectuée à la même concentration de Triton X-100 (voir la Discussion du Chapitre II).

Si le milieu réactionnel est trop concentré en détergent, comme on le voit dans la figure 13, l'activité de l'enzyme diminue à mesure que la concentration du détergent augmente. Ce résultat indique qu'il faut faire des essais à une concentration standard de détergent afin d'apporter des résultats comparables de l'un à l'autre.

Il semble que l'activation de l'activité D, D-carboxypeptidasique membranaire observée en présence du détergent est principalement due au fait que la présence du détergent facilite l'accès des substrats aux enzymes membranaires et finalement la réaction enzymatique. Nous n'avons pas fait d'expériences systématiques qui pourraient servir de base à une comparaison absolue des effets des détergents.

Le Genapol X-100 permet de mesurer directement la concentration en protéines par spectrophotométrie à 280 nm tandis que le Triton X-100 interfère par une forte absorption. A cet égard, nous avons eu recours au Genapol X-100 pour les essais préliminaires de purification de l'activité D, D-carboxypeptidasique de M. smegmatis.

Avec les systèmes D, D-carboxypeptidasiques de Proteus mirabilis, Martin et al. (1975) ont obtenu une solubilisation meilleure avec du Genapol X-100 qu'avec du Triton X-100. Rappelons que dans notre cas le Triton X-100 est un peu plus efficace que le Genapol X-100.

3- Comparaison des valeurs de Km et V de M. smegmatis avec celles d'autres D, D-carboxypeptidases.

Le Km pour le substrat UDP-MurNglyc-(^{14}C)pentapeptide varie de 6 à 17 mM selon la préparation d'enzymes tandis que le V varie de 100 à 250 nmoles/h./mg protéine. La concentration du substrat a été au maximum de 2, 0 mM pour ces mesures.

Par rapport à ce que l'on obtient en général avec les systèmes D, D-carboxypeptidasiques des autres bactéries, par exemple Bacillus sp. et Streptomyces sp., le Km est voisin de la moyenne, mais le V se trouve de 100 à 1000 fois inférieur.

Nous sommes tentés d'expliquer ce phénomène par les considérations suivantes: a) la vitesse du métabolisme des bactéries joue un rôle important; la vitesse de la synthèse du peptidoglycane de M. smegmatis sera beaucoup plus faible que celle, par exemple de E. coli si l'on se rend compte que le temps de génération de M. smegmatis est de 3 heures 20 tandis que celui de E. coli est de 10 fois plus court.
b) nous n'avons pas essayé de chercher le meilleur substrat pour l'activité D, D-carboxypeptidasique. Les études systématiques sur la spécificité des substrats ont été effectuées surtout avec les Streptomyces sp. (Leyh-Bouille et al., [b]1971, 1972) et l'on s'aperçoit que le substrat naturel n'est pas le meilleur pour ces enzymes.

4- Signification du changement de constantes enzymatiques.

Les études cinétiques effectuées avec des enzymes particulaires et solubilisés ont montré que les enzymes subissent un certain degré de transconformation dans des conditions de conservation données.

Il paraît évident, comme nous l'avons vérifié, que les enzymes se conservent mieux à l'état naturel, i.e., sous forme d'enzymes particulaires que sous forme d'enzymes solubilisés. D'autre part, certains enzymes membranaires (surtout transpeptidases) sont connus pour la perte considérable de leur activité enzymatique lorsque les détergents employés pour la solubilisation sont éliminés. Pour le moment nous n'avons pas fait d'études approfondies sur ce que pourraient être les agents dénaturants de l'activité D, D-carboxypeptidasique de notre système.

La conservation à -20° pendant 6 semaines a induit un changement de Km de 16, 7 mM pour les enzymes frais à 5, 1 mM pour les enzymes conservés. En admettant que la transconformation d'un enzyme est accompagnée par un changement de l'activité enzymatique, nous avons eu recours à la variation relative de Km et V pour examiner la nature de cette transconformation.

Nous avons observé que l'activité D, D-carboxypeptidasique conservée sous forme d'enzymes particulaires a subi une perte d'efficacité catalytique (V/Km) de 10 % et que l'activité sous forme d'enzymes solubilisés en a subi de 20 %.

Le fait que l'activité D, D-carboxypeptidasique conservée montre un Km (=5, 1 mM) identique pour des enzymes particulaires et pour des enzymes solubilisés semble dire que les conditions de la conservation ont apporté une influence transconformationnelle qui est défavorable à la vitesse maximale de la catalyse enzymatique.

Dans la Discussion du Chapitre II, nous tenterons de relier ce changement d'efficacité catalytique à celle de la constante d'inhibition pour la pénicilline G.

CHAPITRE II

ETUDE DE L'ACTION DES ANTIBIOTIQUES

INTRODUCTION

Les pénicillines et les céphalosporines, appelées antibiotiques du type β-lactame, sont connues pour leur action antimicrobienne spécifique pour des prokaryotes. Lorsque des bactéries sensibles en croissance sont exposées à la pénicilline, on observe que les bactéries se lysent. Ce phénomène est dû à l'inhibition spécifique de la biosynthèse du peptidoglycane qui est responsable de la rigidité, de la forme et de l'insolubilité de la paroi bactérienne.

En absence des biosynthèses bloquées par la pénicilline, les bactéries perdent leur protection osmotique car leur paroi se lyse par l'action de leurs autolysines.

Depuis l'introduction de la pénicilline dans la médecine pratique, on a remarqué l'apparition de souches bactériennes résistantes à ces antibiotiques soit par la production de pénicillinases (appelées plus généralement β-lactamases) soit par l'acquisition d'une insensibilité intrinsèque. La synthèse de nouveaux dérivés de la pénicilline est alors devenue un besoin, qui a accéléré à son tour le progrès dans l'étude du mode d'action de ces antibiotiques (voir Tableau VI).

De nombreux travaux (Wise et Park, 1965; Izaki et al., 1966) ont montré que la pénicilline agit comme inhibiteur de l'étape finale de la biosynthèse du peptidoglycane, i.e., la transpeptidation.

Une des principales hypothèses concernant le mécanisme d'action de la pénicilline est celle proposée par Tipper et Strominger (1965). La pénicilline serait reconnue préférentiellement par la transpeptidase (et de la même manière par la D, D-carboxypeptidase) à cause de son analogie structurale avec l'acyl-D-alanyl-D-alanine dans la chaîne pentapeptidique, comme représenté par la figure 15.

Dans cette hypothèse, l'acylation irréversible de l'enzyme par l'ouverture de la liaison (CO-N) dans le noyau β-lactame est l'étape essentielle. L'inhibition irréversible à l'appui de cette hypothèse a été observée dans les systèmes D, D-carboxypeptidasiques de Bacillus subtilis (Umbreit et Strominger, [b]1973) et de Bacillus stearothermophilus (Yocum et al., 1974).

Une autre hypothèse sur le mécanisme d'action de la pénicilline est que l'inhibition de l'enzyme cible est "allostérique", en supposant que le site catalytique pourrait être différent du site de fixation de la pénicilline (Leyh-Bouille et al., [a]1971, 1972; Barnett, 1973).

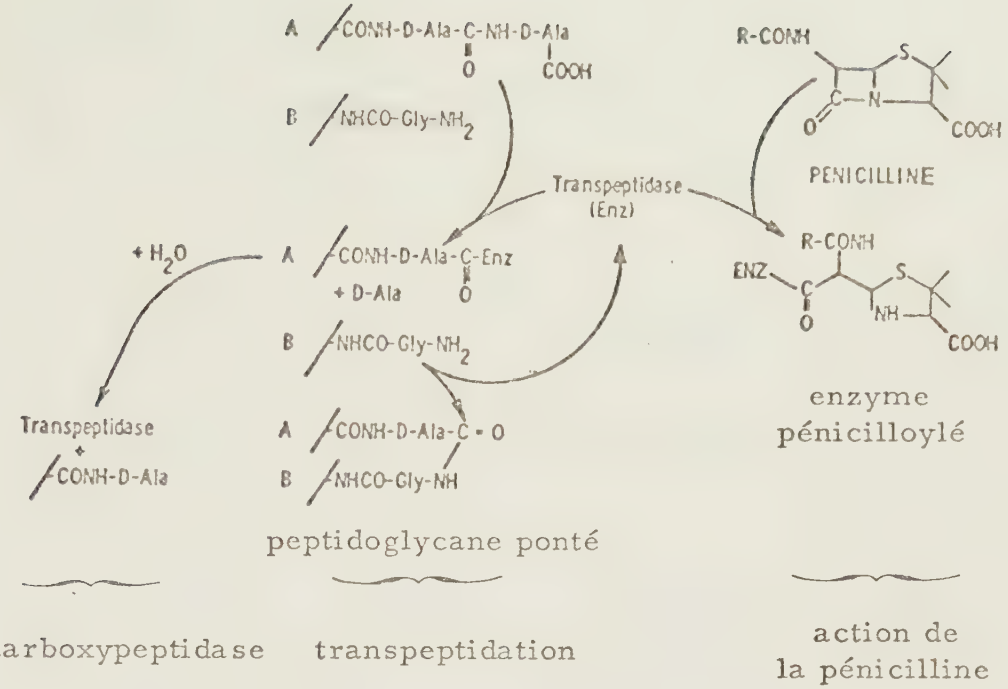


Figure 15 : Mécanisme proposé de transpeptidation et sa relation à la pénicilloylation et à l'activité D, D-carboxypeptidasique. A représente l'extrémité d'une chaîne peptidique. B représente l'extrémité d'un substituant pentaglycyl appartenant à une chaîne peptidique adjacente. Si l'enzyme acylé réagit avec de l'eau à la place de l'accepteur (gauche), l'enzyme est régénéré et le substrat libéré. La réaction serait l'hydrolyse du résidu D-alanine terminal du substrat (activité D, D-carboxypeptidasique) (d'après Tipper et Strominger, 1965).

A l'heure actuelle, on s'aperçoit qu'il manque des données suffisantes et convaincantes qui serviraient à choisir entre ces hypothèses. De plus, des travaux récents ont montré qu'il existe plusieurs protéines cibles auxquelles se fixent les pénicillines d'une façon , soit réversible, soit irréversible (Suginaka et al., 1972; Spratt, 1975).

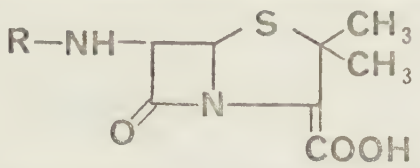
Ces protéines sont en général des enzymes sensibles aux pénicillines et peuvent être classées en trois catégories: a) transpeptidases, essayées avec des substrats soit naturels soit artificiels, b) D, D-carboxypeptidases, c) endopeptidases qui coupent des liaisons interpeptidiques du peptidoglycane.

Parmi toutes ces activités, la première est particulièrement intéressante parce que l'action antimicrobienne de la pénicilline s'effectue au niveau de la synthèse de la liaison interpeptidique au cours de la biosynthèse du peptidoglycane. Lorsque l'on approfondit l'étude avec des systèmes enzymatiques de plus en plus purifiés, on s'aperçoit qu'il existe de multiples systèmes qui présentent une grande variété dans leur sensibilité aux pénicillines et que le mode d'action de la pénicilline est plus complexe que celui communément admis.

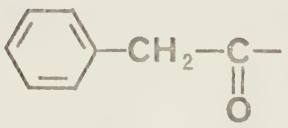
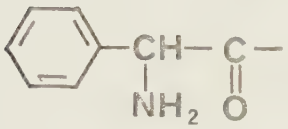
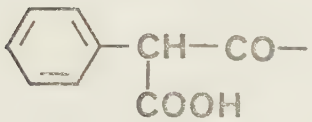
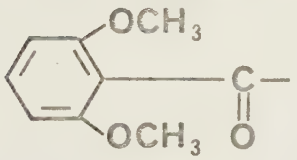
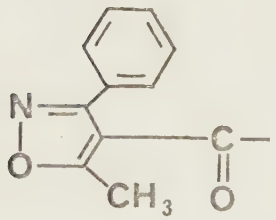
Dans ce contexte des données sur l'action de la pénicilline, nous nous sommes intéressés à étudier les interactions de la pénicilline avec le système enzymatique de M. smegmatis. Dans le Chapitre I, nous avons démontré certaines des propriétés de l'activité D, D-carboxy-peptidasique sous forme d'enzymes particulaires et d'enzymes solubilisés. Dans ce Chapitre II seront exposés les résultats de nos études sur l'interaction des antibiotiques avec des cellules et avec des systèmes enzymatiques de M. smegmatis.

La première partie est consacrée à l'étude sur l'inhibition de la croissance des bactéries par divers antibiotiques du type β-lactame ainsi que par d'autres antibiotiques. Dans une deuxième partie, nous étudierons l'interaction de la pénicilline G et de quelques autres antibiotiques du type β-lactame sur les systèmes enzymatiques décrits au Chapitre I.

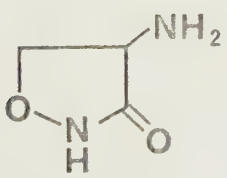
Tableau 6. Liste des antibiotiques employés.



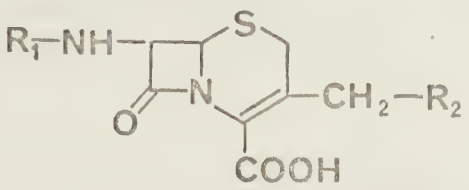
structure générale des pénicillines

R—	pénicilline
H—	Acide 6-aminopénicillinamique
	Benzylpénicilline (pénicilline G)
	Ampicilline
	Carbénicilline
	Méthicilline
	Oxacilline

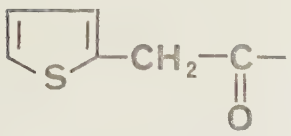
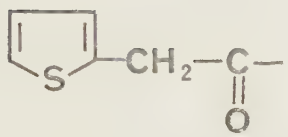
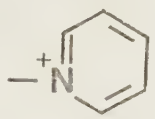
Ethambutol



D-Cyclosérine



structure générale
des céphalosporines

R_1	R_2	céphalosporine
H—	$-O-C(=O)-CH_3$	Acide 7-aminocéphalosporinamique
$H_2N-CH(COOH)-(CH_2)_3-C(=O)-$	$-O-C(=O)-CH_3$	Céphalosporine C
	$-O-C(=O)-CH_3$	Céphalothine
		Céphaloridine

I - ACTION DES ANTIBIOTIQUES SUR LA CROISSANCE DE M. smegmatis ATCC 21732.

Ces études ont été effectuées en vue d'établir une corrélation entre la concentration léthale des antibiotiques pour des bactéries intactes et le site de leur action léthale.

1 - Pénicilline G.

Nous avons abordé cette étude par la culture de bactéries dans le milieu de Brodie (voir Méthodes bactériologiques), en y ajoutant une concentration croissante de pénicilline G. Le détail de la manipulation est décrit dans la légende de la figure 16.

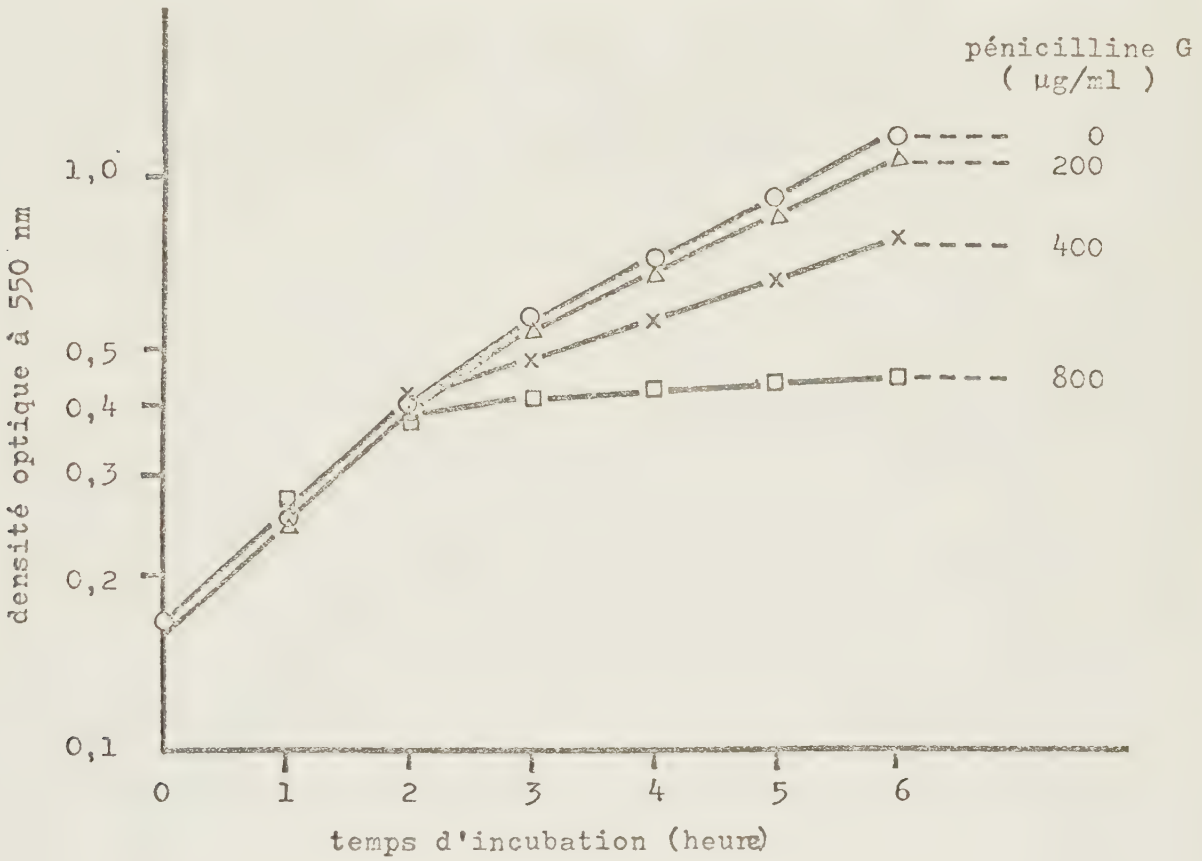


Figure 16: Effets d'inhibition de la pénicilline G sur la croissance de M. smegmatis ATCC 21732. Ces microorganismes ont été mis en culture dans des Erlens de 250 ml contenant 100 ml du milieu de Brodie. Les flacons sont incubés à 37° et agités à 150 rev./min. dans un incubateur New Brunswick Giratory Shaker. Les solutions de pénicilline G, préparées extemporanément sont ajoutées aux concentrations indiquées sur la figure au moment de l'ensemencement des bactéries. La croissance est suivie par la mesure de la densité optique à 550 nm avec le spectrophotomètre Zeiss PMQ II.

Cette figure montre que la concentration minimale d'inhibition de la croissance (MIC) par la pénicilline G est de 200 µg/ml. Cette valeur justifie que l'on classe M. smegmatis parmi des bactéries insensibles à la pénicilline G, en tenant compte de ce que l'action léthale de la pénicilline G n'est plus spécifique à une valeur si haute de la MIC.

A titre de comparaison, la même étude a été faite sur M. phlei ATCC 356, une souche voisine de M. smegmatis; nous avons observé que l'inhibition de la croissance commence à partir de 10 µg/ml de pénicilline G.

2- Ethambutol.

Les effets de l'inhibition par l'éthambutol ont été étudiés de la même manière que par la pénicilline G. Le résultat, comme on le voit sur la figure 17, montre que l'inhibition de la croissance est très forte avec une MIC inférieure à 0, 5 µg/ml. L'inhibition apparaît même à une concentration de 0, 1 µg/ml d'éthambutol.

Figure 17 : Inhibition de la croissance de M. smegmatis par l'éthambutol.

3- Autres antibiotiques.

3-1 Antibiotiques du type β-lactame:

Comme des changements dans la chaîne latérale ou dans le noyau d'un antibiotique du type β-lactame se sont montrés capables d'induire une grande variation de sensibilité des bactéries, par exemple l'amidino-pénicilline pour E. coli (Park et Burman, 1973), nous nous sommes intéressés à l'étude de la sensibilité de M. smegmatis vis-à-vis d'autres antibiotiques tels que la méthicilline, la céphaloridine, la carbénicilline, l'oxacilline et l'ampicilline. Pour le détail de la manipulation, voir les Méthodes bactériologiques.

M. smegmatis s'est montré résistant à la méthicilline (10 µg/ml), à la céphaloridine (30 µg/ml), à la carbénicilline (100 µg/ml), à l'oxacilline (10 µg/ml), et à l'ampicilline (10 µg/ml).

3-2 Rifampicine, streptomycine et D-cyclosérine:

Leur action a été étudiée en ensemençant M. smegmatis sur des tubes inclinés de milieu de Jensen contenant des concentrations variables de ces antibiotiques.

La rifampicine à 40 µg/ml s'est montrée faiblement inhibitrice tandis que la streptomycine est un fort inhibiteur exerçant son inhibition à 2 µg/ml. Enfin, la D-cyclosérine à 40 µg/ml n'a aucun effet d'inhibition sur la croissance de M. smegmatis. Il est à noter que la D-cyclosérine est un inhibiteur parfait à 20 µg/ml sur M. phlei.

II - ACTION DES ANTIBIOTIQUES SUR L'ACTIVITE D, D-CARBOXYPEPTIDASIQUE.

Les effets des antibiotiques (surtout du type β-lactame) sur l'activité D, D-carboxypeptidasique des enzymes particulaires et des enzymes solubilisés ont été étudiés en présence de Triton X-100. L'inhibition est montrée par la représentation de Lineweaver et Burk en utilisant l'UDP-MurNglyc-L-Ala-γ-D-Glu-meso-A_2pm-D-(^{14}C)Ala-D-(^{14}C)-Ala comme substrat. Dans les conditions d'essai normales, la concentration du substrat varie de 0, 05 à 0, 15 Km.

1- Etude de l'inhibition par la pénicilline G.

1-1 Action sur les enzymes frais:

a) Activité D, D-carboxypeptidasique en fonction de la concentration en pénicilline G.

L'inhibition de l'activité D, D-carboxypeptidasique est étudiée en fonction de la concentration de l'antibiotique en vue d'élucider la relation qui

existerait entre la concentration des antibiotiques inhibant les enzymes cibles et celle inhibant la croissance des bactéries.

L'activité D, D-carboxypeptidasique a été analysée dans trois préparations différentes: des enzymes particulaires, des enzymes solubilisés et des enzymes résiduels (voir solubilisation de l'activité D, D-carboxypeptidasique, Chapitre I). Les essais ont été effectués en présence de 0, 5 % de Triton X-100, et les résultats sont représentés dans la figure 18.

Nous voyons que tous les enzymes frais sont inhibés à partir d'une concentration de 0, 1 µg/ml de pénicilline G. 85 % de l'activité D, D-carboxypeptidasique sont inhibés à 1, 0 µg/ml.

b) Cinétique d'inhibition de la D, D-carboxypeptidase.

D'après les résultats précédents de l'inhibition en fonction de la concentration de pénicilline G, nous avons choisi une zone de concentration de 0, 1 à 1, 0 µg/ml, dans laquelle est effectuée l'étude cinétique de l'inhibition de la D, D-carboxypeptidase.

Le résultat des analyses nous montre que la pénicilline agit comme inhibiteur non-compétitif avec un Ki de 4, 2 x 10-6 M (figure 19).

1-2 Effets de la conservation à -20° sur l'inhibition de l'activité D, D-carboxypeptidasique:

Nous avons démontré dans le Chapitre I que la conservation des enzymes conduit à un changement des constantes enzymatiques plus ou moins grand selon les conditions auxquelles les enzymes ont été soumis. Dans cette partie seront exposés les résultats des études qui ont été menées sur les effets de la conservation sur l'inhibition de l'activité D, D-carboxypeptidasique par la pénicilline G.

Les trois sources d'enzymes, i.e., des enzymes particulaires, des enzymes solubilisés et des enzymes résiduels, ont été conservées à -20°, et l'activité D, D-carboxypeptidasique a été testée en présence de 0, 5 % de Triton X-100 au cours de la conservation.

a) Cinétique d'inhibition:

En vue d'étudier le changement éventuel de la sensibilité de la D, D-carboxypeptidase à la pénicilline G par la conservation à -20°, nous avons utilisé la même concentration de 0, 5 µg/ml (ou $1,4.10^{-6}$M) que pour l'étude cinétique avec des enzymes frais.

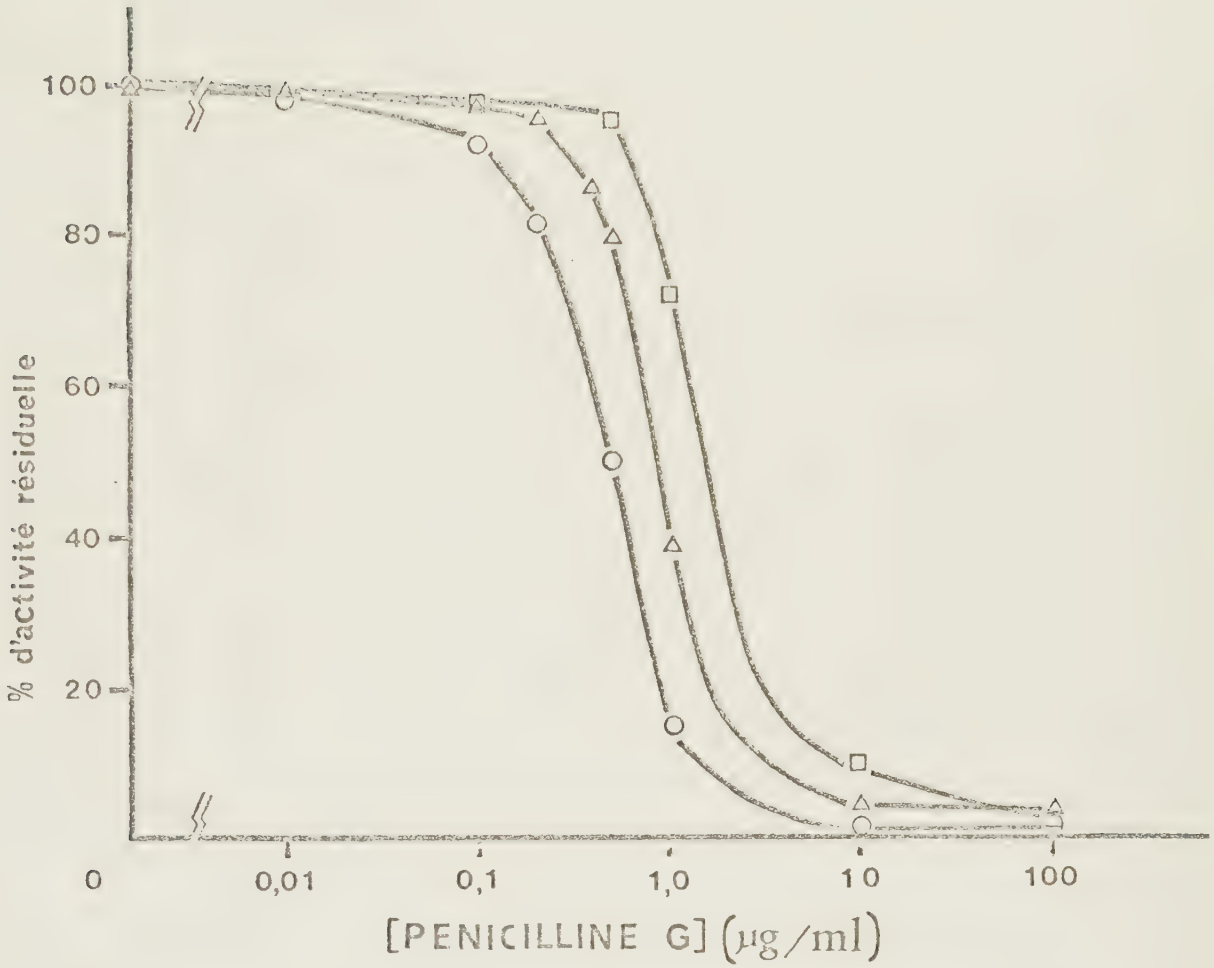


Figure 18 : Inhibition de l'activité D, D-carboxypeptidasique en fonction de la concentration de pénicilline G. (o — o) représente l'activité des enzymes frais dans les trois états différents où ils ont été étudiés: enzymes particulaires, enzymes solubilisés et enzymes résiduels. Ces enzymes ont été conservés à -20° pendant 6 semaines et l'activité D, D-carboxypeptidasique a été analysée de la même façon, toujours en présence de 0, 5 % de Triton X-100 comme décrit dans l'essai standard. (△—△), enzymes particulaires et enzymes résiduels après 6 semaines de conservation. (□ — □) enzymes solubilisés après 6 semaines de conservation.

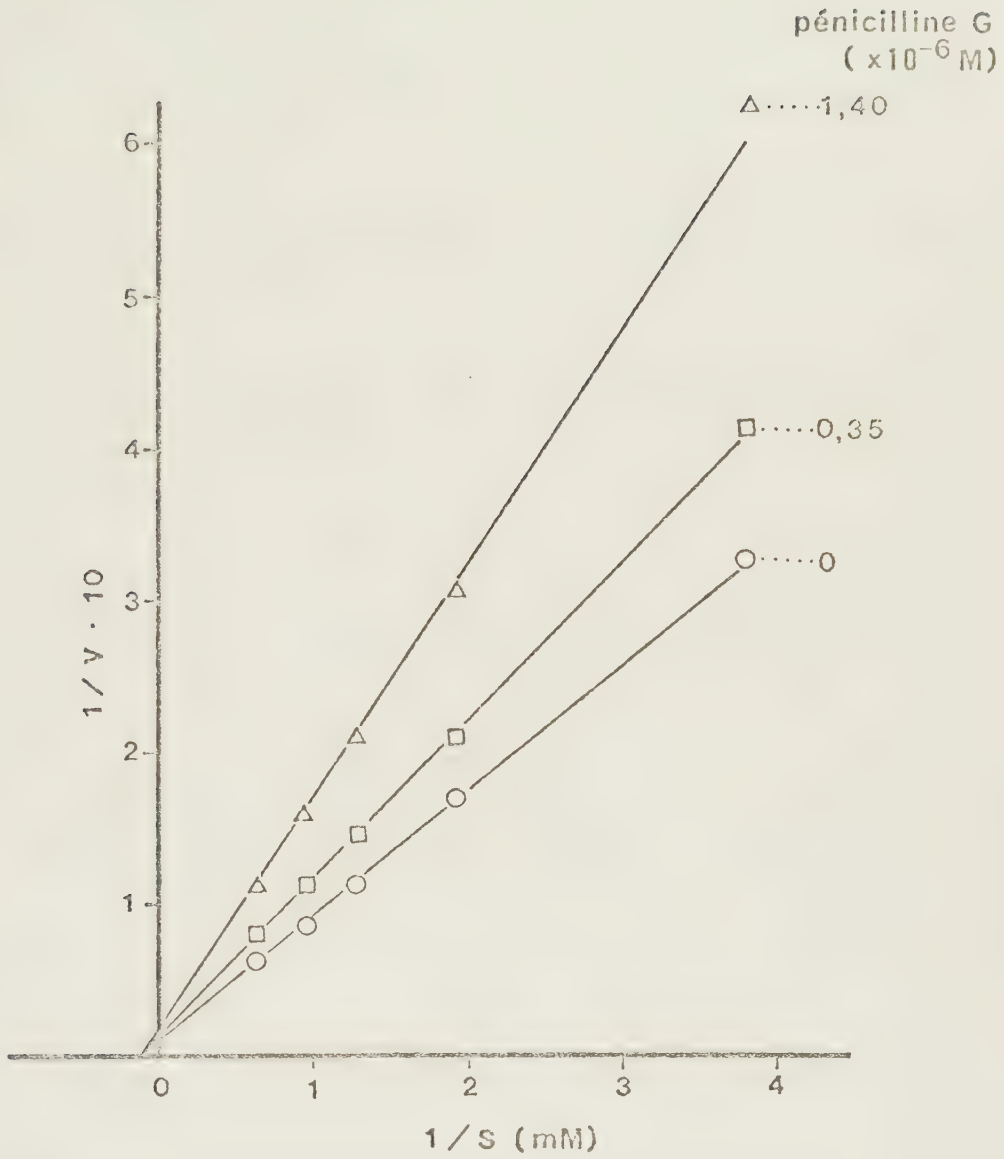


Figure 19 : Inhibition par la pénicilline G de l'activité D, D-carboxypeptidasique des enzymes particulaires frais (conditions de l'essai standard). La représentation est celle de Lineweaver et Burk. Concentration en pénicilline G , (Δ — Δ) 1,40.10-6, (□ — □) 0,35.10-6M, (○ — ○) témoin sans pénicilline.
v = nmole D-(^{14}C)Ala/h/mg protéine.

Les essais effectués après 6 semaines à -20° sont représentés dans la figure 20 pour des enzymes particulaires, et dans la figure 21 pour des enzymes solubilisés. Nous voyons qu'à la concentration de pénicilline G employée l'inhibition sur des enzymes solubilisés ne se manifeste pas tandis que celle sur des enzymes particulaires est devenue très faible dans les conditions d'essai.

Des phénomènes semblables de changement de la sensibilité à la pénicilline G ont été observés à plusieurs reprises sur le plan qualitatif pour des durées de conservation de 2 ou 3 semaines.

Dans la limite de la précision que les conditions d'analyses employées nous permettent, nous avons tenté de comparer le changement exprimé en Ki (Tableau VII).

Tableau VII

Influence de la conservation à -20° pendant 6 semaines sur l'efficacité enzymatique et sur la constante d'équilibre d'inhibition.

Enzyme (conservation)	Efficacité enzymatique (V/Km)	Efficacité relative	Ki (10^{-6}M)	Changement relatif en Ki
Frais (0) { particulaires solubilisés	15,0	1,0	4,2	1,0
Particulaires (6 semaines)	13,5	0,9	10,5	2,4
Solubilisés (6 semaines)	12,0	0,8	>30	>7

Par ailleurs, des essais avec les enzymes particulaires conservés à -20° pendant 6 semaines ont été effectués d'après la méthode de Dixon (figure 22). Comme on le voit, l'extrapolation est cependant trop ambigue pour obtenir une valeur de Ki plus précise (Dixon, 1953).

L'interprétation de cette figure sera développée dans la Discussion de ce Chapitre (voir Mécanisme d'action de la pénicilline).

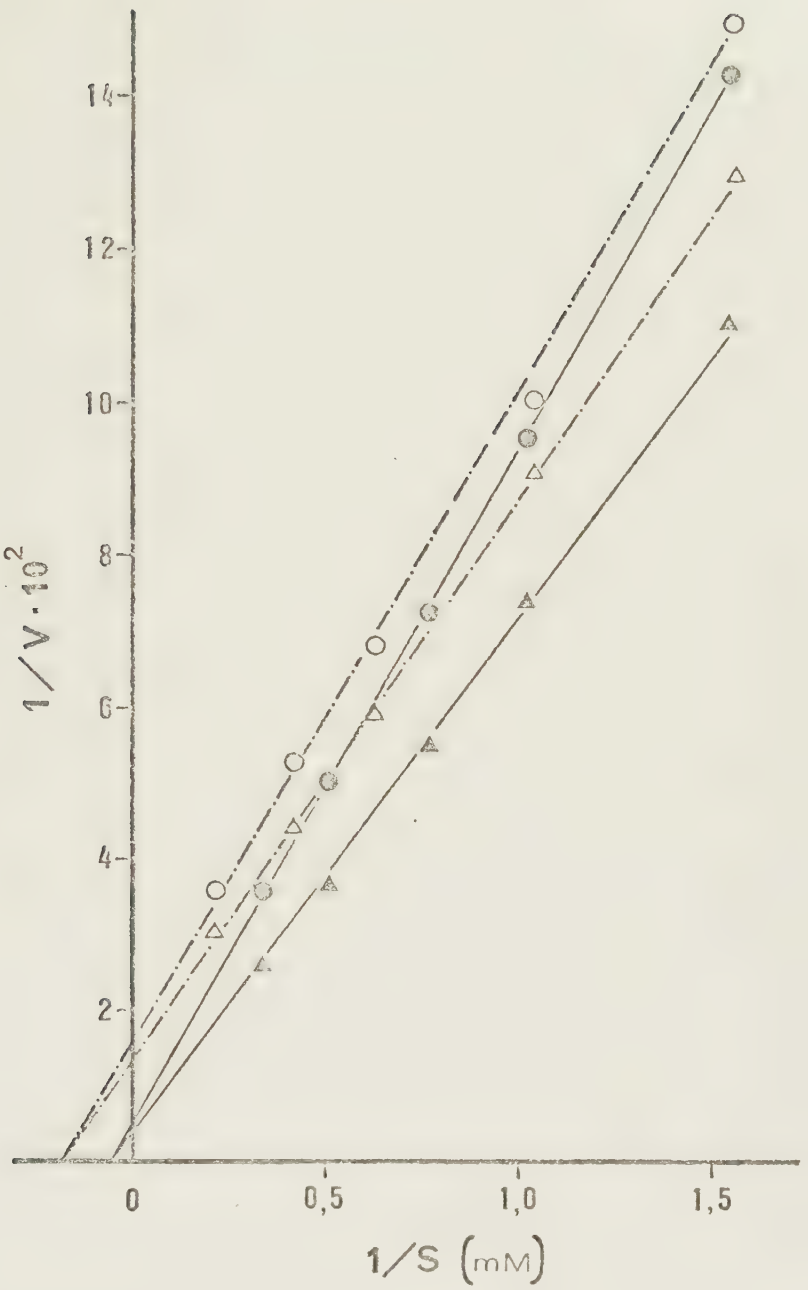


Figure 20 : Influence de la conservation à -20° sur l'activité D, D-carboxypeptidasique des enzymes particulaires et sur son inhibition par la pénicilline G. La représentation est celle de Lineweaver et Burk. Enzymes frais en absence (△ — ▲) et en présence (● — ●) de pénicilline G, $1,4.10^{-6}$M. Enzymes conservés à -20° pendant 6 semaines; activité mesurée en absence (△·—·—·△) et en présence (○—·—·○) de pénicilline G, $1,4.10^{-6}$M . v = nmole D-(^{14}C)Ala/h./mg protéine.

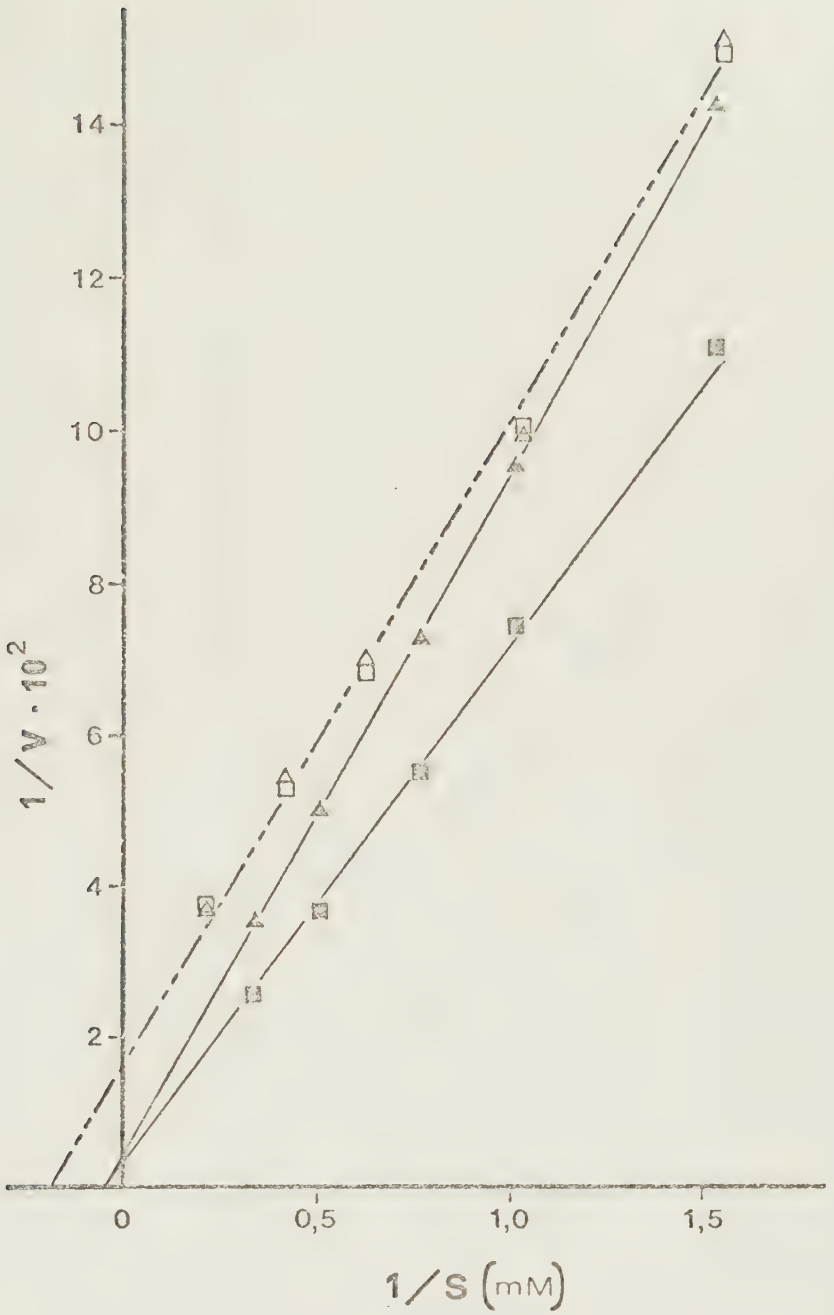


Figure 21 : Influence de la conservation à -20° sur l'activité D, D-carboxypeptidasique des enzymes solubilisés et sur son inhibition par la pénicilline G. La représentation est celle de Lineweaver et Burk. Les enzymes proviennent du même lot d'enzymes particulaires (figure 20). Enzymes frais en absence (■——■) et en présence (▲——▲) de pénicilline G, $1,4.10^{-6}$M. Enzymes conservés à -20° pendant 6 semaines sous forme d'enzymes solubilisés; activité mesurée en absence (□·——·□) et en présence (△·——·△) de pénicilline G, $1,4.10^{-6}$M.
v = nmole D-(^{14}C)Ala/h./mg protéine.

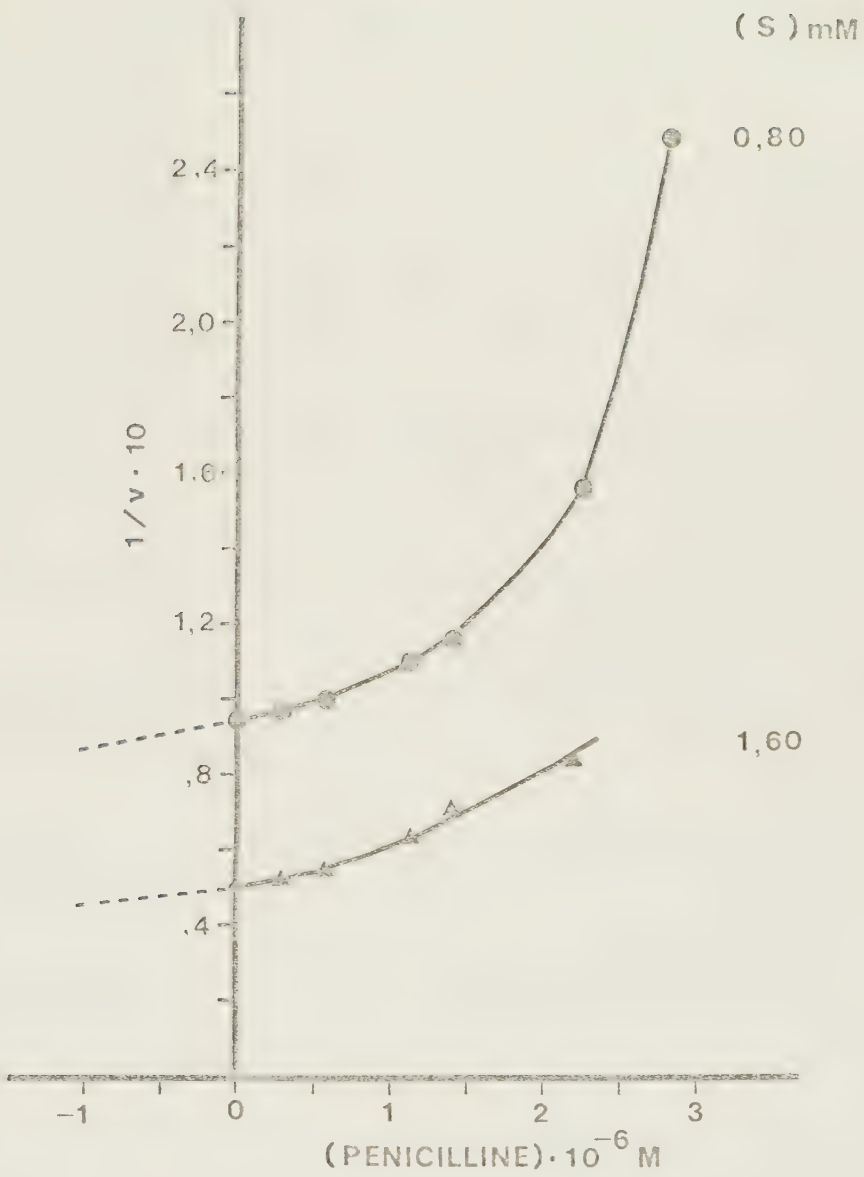


Figure 22 : Représentation de Dixon pour l'inhibition de l'activité D, D-carboxypeptidasique par la pénicilline G. Les enzymes particulaires ont été conservés à -20° pendant 6 semaines et l'activité a été testée avec 360 µg en protéines. Les autres conditions sont décrites dans l'essai standard. Les solutions de pénicilline G ont été préparées juste avant l'emploi.
v = nmole D-(^{14}C)Ala/h./mg protéine.

b) Activité D, D-carboxypeptidasique en fonction de la concentration en pénicilline G.

Tenant compte des changements constatés de la sensibilité à $1,4.10^{-6}$M de pénicilline G, nous avons voulu étudier cette influence de la conservation en fonction de la concentration en pénicilline G.

Dans la figure 18 sont représentés les résultats obtenus avec les trois sources d'enzymes conservés à -20° pendant 6 semaines, en même temps que ceux des enzymes frais. Nous voyons que les enzymes particulaires sont moins sensibles après la conservation. Dans le cas des enzymes solubilisés, le changement de la sensibilité est encore plus net. A la concentration de 0, 5 µg/ml (= $1,4 \times 10^{-6}$M) en pénicilline G, très peu d'inhibition est observée.

Ces résultats expliquent le grand changement du Ki pour les enzymes particulaires et l'impossibilité de mesurer un Ki à la concentration de pénicilline G employée pour les enzymes solubilisés.

2- Etude de l'inhibition par d'autres antibiotiques.

L'inhibition de l'activité D, D-carboxypeptidasique par d'autres antibiotiques a été étudiée en fonction de la concentration en antibiotiques de la même manière qu'avec la pénicilline G. Les résultats sont présentés dans le Tableau VIII.

3- Réversibilité par dialyse de l'inactivation des enzymes par la pénicilline G.

En vue d'étudier une réactivation éventuelle de l'activité D, D-carboxypeptidasique inactivée par la pénicilline G., nous avons choisi la méthode de dialyse. Le détail de la manipulation est décrit dans la légende de la figure 23.

La réactivation de l'activité D, D-carboxypeptidasique a abouti à 8 heures de dialyse à un maximum de 30 % par rapport au témoin sans pénicilline. Une dialyse prolongée jusqu'à 24 heures a montré 23 % de récupération de l'activité D, D-carboxypeptidasique.

Tableau VIII

Inhibition de l'activité D, D-carboxypeptidasique par des antibiotiques. Une préparation fraîche d'enzymes solubilisés est mise en étude d'inhibition en présence de concentrations croissantes d'antibiotiques. L'activité D, D-carboxypeptidasique résiduelle est exprimée en % par rapport au témoin qui ne contient pas d'antibiotiques. La valeur de ID_{50} est définie comme la concentration d'antibiotique qui diminue l'activité enzymatique de 50 %. Ici cette valeur est calculée approximativement à partir de résultats du tableau.

Antibiotique	ID_{50} (µg/ml)	% d'activité D, D-carboxypeptidasique résiduelle à une concentration (µg/ml) de				
		0,01	0,1	1,0	10	100
Pénicilline	0,50	98,0	92,5	15,0	1,3	1,2
Ampicilline	0,32	92,6	80,3	18,6	2,7	0,6
Céphalosporine C	0,44	98,3	95,0	19,3	1,8	0,3
Carbénicilline	2,13	-	93,4	77,7	-	0,1
Ethambutol	-	-		100	-	100

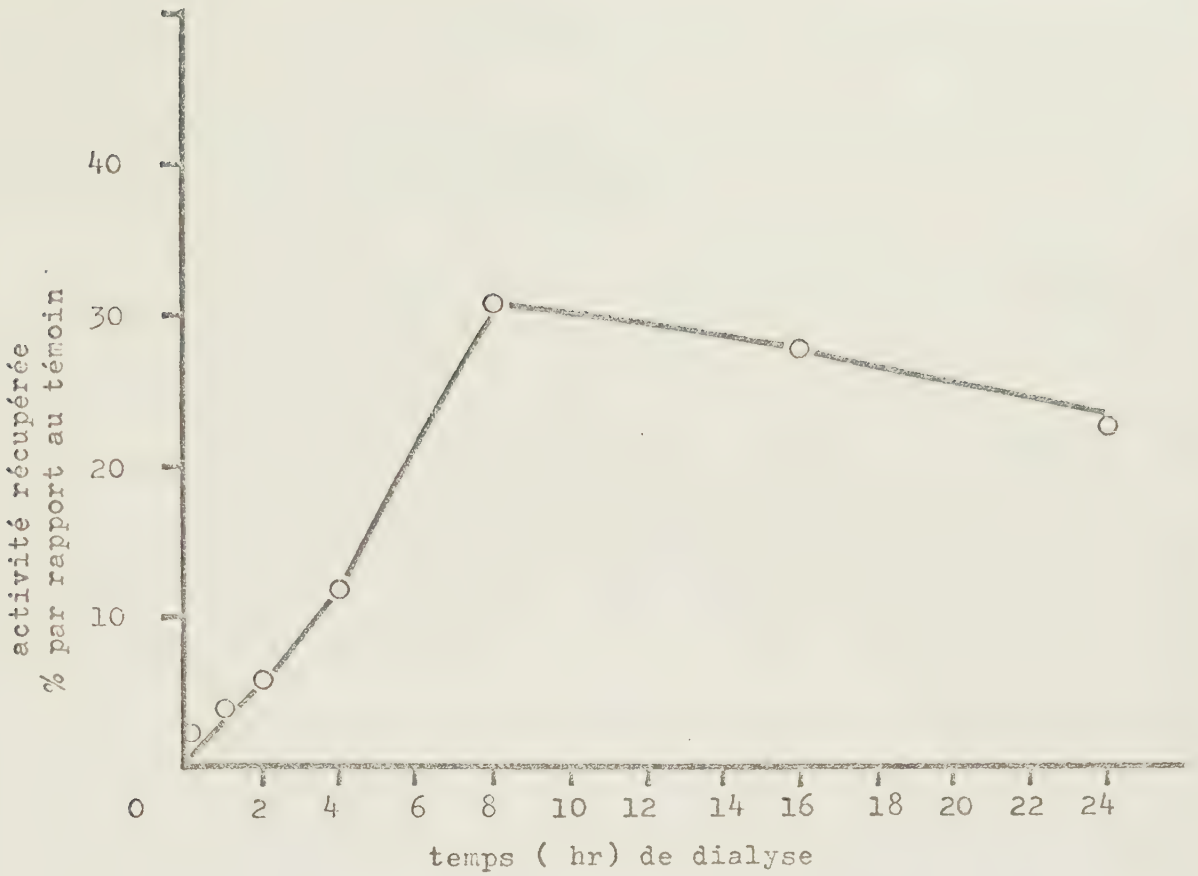


Figure 23 : Réactivation par dialyse de l'activité D, D-carboxypeptidasique inhibée par la pénicilline G.

Une préparation fraîche d'enzymes solubilisés (500 µl) a été inhibée à 100 % par une préincubation à 21° pendant 40 min. avec la pénicilline G, $2,8.10^{-3}$M. Les enzymes préincubés ont alors été placés dans un tube de dialyse (Visking diamètre 20/32) lui-même placé dans une fiole de 100 ml. Une autre fraction d'enzymes solubilisés sert de témoin et subit le même procédé mais sans pénicilline.

Le liquide d'élution est renouvelé constamment à 21° à l'aide d'une pompe péristaltique débitant 40 ml/h. Le solvant de dialyse est composé de sodium cacodylate-HCl 20 mM, pH 6, 1, Triton X-100 1 % (v/v) et $MgCl_2$ 10 mM. Des quantités aliquotes de 25 µl sont prélevées à différents intervalles de temps et l'activité D, D-carboxypeptidasique est testée comme il est décrit dans l'essai standard. A chaque prélèvement une autre quantité aliquote de 25 µl sert à doser la concentration en protéines. En ordonnée est représenté le % de l'activité récupérée par rapport au témoin.

DISCUSSION

1 - Relation entre la sensibilité des cellules entières et de certains enzymes à divers antibiotiques.

Le fait que la croissance de M. smegmatis est inhibée à partir de 200 µg/ml en pénicilline G indique que cette souche appartient à la classe de bactéries que l'on appelle "résistantes" à cet antibiotique. L'étude d'inhibition par la pénicilline G effectuée sur l'activité D, D-carboxypeptidasique des enzymes particulaires de M. smegmatis nous a montré que l'inhibition apparaît à 0, 1 µg/ml en pénicilline. Cette différence de 2.000 fois de sensibilité nous oblige à postuler soit que par suite de la présence d'une barrière de perméabilité extérieure à la membrane cytoplasmique ou par suite de l'éventuelle production de β-lactamases la pénicilline n'atteint pas l'enzyme cible in vivo, soit que l'inhibition de la D, D-carboxypeptidase membranaire n'est pas léthale pour la bactérie.

L'étude sur B. subtilis (Blumberg et Strominger, 1971) a conduit à la conclusion que la D, D-carboxypeptidase n'est pas l'enzyme cible de l'action léthale de la pénicilline. Le rapport entre la dose d'antibiotique nécessaire pour inhiber l'activité D, D-carboxypeptidasique et celle nécessaire à l'inhibition de la croissance des bactéries varie très largement selon les souches et les antibiotiques employés. On a constaté que dans la plupart des cas, la D, D-carboxypeptidase se caractérise par une forte sensibilité aux pénicillines. Elle est inhibée à des concentrations environ 100 fois inférieures à celles nécessaires pour inhiber la croissance de la cellule bactérienne.

A présent, on conçoit que le rôle physiologique joué par la D, D-carboxypeptidase serait de contrôler le degré du pontage interpeptidique dans le réseau du peptidoglycane, en tenant compte du fait que le produit de la réaction D, D-carboxypeptidasique n'est pas capable de servir de donneur dans la transpeptidation. Cette hypothèse n'est pas toujours vérifiée, si nous prenons un exemple parmi d'autres. B. subtilis a été cultivé dans un milieu contenant de l'antibiotique à une dose suffisante pour inhiber in vitro plus de 95 % de l'activité D, D-carboxypeptidasique sans que l'on constate une augmentation décelable du degré de pontage interpeptidique (Sharpe et al., 1974).

Comme nous l'avons brièvement dit ci-dessus, en ce qui concerne l'insensibilité de la cellule intacte aux antibiotiques, on peut envisager deux mécanismes: le mécanisme intrinsèque, et la production de β-lactamases ou amidases.

1) Le mécanisme intrinsèque comprend soit le développement de barrières telles dans la paroi que des antibiotiques ne sont pas capables de pénétrer jusqu'aux enzymes cibles (ex. Pseudomonas aeruginosa étudié par Suginaka et al., 1975), soit l'acquisition de l'insensibilité intrinsèque des enzymes cibles. Le dernier cas, comme nous l'avons remarqué dans la Discussion du Chapitre I, semble intéressant car la L, D-carboxypeptidase qui pourrait fonctionner dans certains cas comme L, D-transpeptidase s'est révélée insensible à la pénicilline G (ex. E. coli étudié par Izaki et Strominger, 1968). Coyette et al. (1974) ont montré que la L, D-transpeptidase de S. faecalis est 95 fois moins sensible à la pénicilline G que la bactérie.

Si cette possibilité est applicable à M. smegmatis, la résistance de cette souche à la pénicilline serait bien expliquée de la façon suivante: la liaison "atypique" meso-A_2pm-meso-A_2pm, qui serait formée par l'activité L, D-transpeptidasique et qui représente plus de 30 % des liaisons interpeptidiques (le reste étant représenté par des liaisons classiques D-Ala-(D)-meso-A_2pm, Wietzerbin et al., 1974) pourrait bien conserver à la bactérie sa forme originale malgré l'inhibition éventuelle de l'activité D, D-transpeptidasique et de l'activité D, D-carboxypeptidasique.

Nos études n'ont pas encore été poussées jusqu'à l'étude de l'activité transpeptidasique, mais l'étude de l'activité L, D-carboxypeptidasique et de son inhibition par la pénicilline G et l'éthambutol va être bientôt entreprise.

Nous avons montré que l'éthambutol est un fort inhibiteur de la croissance de M. smegmatis (MIC inférieure à 0, 5 µg/ml) tandis que l'activité D, D-carboxypeptidasique des enzymes particulaires n'est pas inhibée à une concentration de 100 µg/ml. De nombreuses observations de l'action de l'éthambutol sur les Mycobactéries ont confirmé que l'inhibition ne se révèle qu'avec des cellules en prolifération (Gale et McLain, 1963; Forbes et al., 1965).

Il est probable que l'activité L, D-carboxypeptidasique, également L, D-transpeptidasique, serait l'enzyme cible de l'inhibition car, d'après l'hypothèse de E. Lederer (1975) sur son mode d'action, l'éthambutol agirait comme un inhibiteur de la transpeptidation du type meso-A_2pm-meso-A_2pm par son analogie structurale avec les substrats.

2) La production de β-lactamases ou amidases est dans certains cas, responsable de la résistance des bactéries aux antibiotiques du type β-lactame (Citri et Pollock, 1966).

Chez les Mycobactéries on reconnaît que la plupart des souches produisent des pénicillinases et surtout, qu'il y a chez M. smegmatis (souche Borstel SN2, Muftic, 1962) une production élevée de pénicillinase endocellulaire qui se libère au moment de l'autolyse. Dans la mesure de nos connaissances, toutes les tentatives, jusqu'à présent, d'isolement des pénicillinases de Mycobactéries, ont été vouées plus ou moins à des échecs; en effet, ces enzymes présentent beaucoup de subtilité et de complexité dans leur manipulation. Nous n'avons pas encore entrepris l'étude systématique de β-lactamases ni d'amidases de M. smegmatis.

En somme, nous ne savons pas encore si la résistance de M. smegmatis à la pénicilline provient de l'insensibilité intrinsèque des enzymes cibles autres que la D, D-carboxypeptidase membranaire, ou de la fonction barrière de la paroi qui empêche le libre accès des antibiotiques ou de la présence de β-lactamases et d'amidases d'une haute activité, ou d'une combinaison de tous ces facteurs.

2- Mécanisme d'action de la pénicilline.

L'étude cinétique de l'inhibition du système D, D-carboxypeptidasique de M. smegmatis a montré que la pénicilline agit apparemment comme un inhibiteur non-compétitif. Autrement dit, la pénicilline n'a pas été reconnue comme un analogue du substrat UDP-MurNglyc-L-Ala-γ-D-Glu-meso-A2pm-D-Ala-D-Ala.

L'expérience de dialyse a montré que l'inactivation est partiellemen réversible. Le fait qu'au cours de la dialyse la réactivation passe par un maximum (voir figure 23) semble signifier que les enzymes réactivés sont plus susceptibles à la dénaturation que les enzymes témoins.

Les effets de la conservation à -20° pendant 6 semaines méritent certaines remarques: la sensibilité à la pénicilline G, exprimée par le Ki, augmente d'environ 3 fois pour les enzymes particulaires et de 7 fois pour les enzymes solubilisés. Dans la Discussion du Chapitre I, nous avons remarqué qu'une conservation de même durée induit une perte d'efficacité enzymatique de l'ordre de 10 % pour des enzymes particulaires et de 20 % pour des enzymes solubilisés. Si l'on cherche à relier la perte d'efficacité et le changement de sensibilité à la pénicilline G, on trouve aisément que ces données sont compatibles avec deux interprétations: 1) que la pénicilline est un inhibiteur "non-compétitif", 2) que la pénicilline se fixe sur un site différent du site de fixation du substrat. Cette variation apparemment non-corrélée de l'efficacité catalytique et de la sensibilité à la pénicilline serait difficile à expliquer en supposant que l'inhibition par la pénicilline ait été "compétitive".

Les courbes d'inhibition de l'activité D, D-carboxypeptidasique en fonction de la concentration en pénicilline G nous ont permis de voir que l'inactivation par la pénicilline résulte d'une interaction stoïchiométrique. Ces courbes de la figure 18 qui ressemblent à des courbes de titrage permettent d'envisager que l'enzyme possède soit un seul site de fixation pour la pénicilline soit plusieurs sites de fixation d'un caractère rigoureusement identique. Avec des enzymes purifiés jusqu'à homogénéité, cette méthode de titrage permet une estimation du site pour la fixation de la pénicilline en terme de rapport molaire.

En fait, l'étude effectuée avec la D, D-carboxypeptidase-transpeptidase exocellulaire de Streptomyces R 39 a montré que le complexe inactif enzyme-pénicilline est formé sur une base équimolaire (Frère et al., 1974). Un autre exemple d'un pareil résultat est fourni par Umbreit et Strominger ([b]1973) avec la D, D-carboxypeptidase de B. subtilis.

Néanmoins, tous ces arguments sont encore loin d'être suffisants pour fournir des preuves en faveur de l'une des deux hypothèses sur le mécanisme d'action de la pénicilline, mentionnées auparavant dans l'Introduction du Chapitre II.

1) Nos expériences ont montré que la représentation de l'inhibition par la méthode de Dixon (figure 19) donne une série de courbes non-linéaires ou concaves. Un phénomène semblable a été rencontré dans quelques exemples, notamment la D, D-carboxypeptidase-transpeptidase de Streptomyces R 39 qui est inhibée par la pénicilline G d'une façon non-compétitive (Leyh-Bouille et al., 1972). Ce phénomène s'explique dans la mesure où l'enzyme est inhibé par une liaison irréversible ou tellement forte que le schéma sur lequel repose la représentation de Dixon n'est plus valable. Il se manifeste dans le cas où la concentration de l'enzyme employé est proche de celle de l'inhibiteur reflétant par conséquent un phénomène de titrage.

2) L'inhibition non-compétitive, comme nous la voyons dans notre système D, D-carboxypeptidasique de M. smegmatis, n'est pas convaincante pour les raisons suivantes:
la connaissance actuelle du mécanisme d'action de la pénicilline admet que la pénicilline est elle-même un substrat (Frère et al., 1975; Hammarström et Strominger, 1975). L'interaction se poursuit en 3 étapes séquentielles:

a) formation d'un complexe équimolaire inactif par un processus d'un équilibre rapide, b) isomérisation irréversible vers un complexe modifié avec une constante de vitesse comparable à celle d'une vraie réaction enzymatique, c) dégradation spontanée et irréversible de ce dernier complexe conduisant à la réactivation de l'enzyme et à la libération

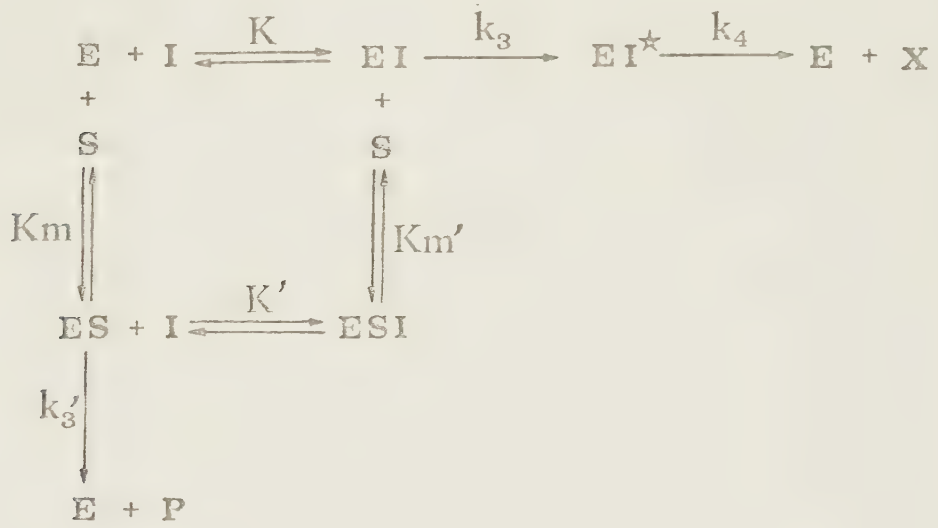
d'une molécule d'antibiotique sous une forme chimiquement modifiée.

$$E + I \underset{a)}{\overset{K}{\rightleftharpoons}} EI \xrightarrow[b)]{k_3} EI^{\star} \xrightarrow[c)]{k_4} E + X$$

Dans tous les cas étudiés, la dernière étape est un processus très lent, et l'un des produits de la dégradation a été récemment identifié comme la phénylacétylglycine (Frère et al., 1976).

Il en résulte que l'inhibition apparente due à la première étape réversible sera donc influencée par deux étapes suivantes irréversibles. Ghuysen et al. (1975) ont montré que l'inhibition compétitive n'exclut pas l'inhibition non-compétitive et vice versa, c'est-à-dire, que l'inhibition apparente dépendrait non seulement de l'enzyme mais aussi de la condition et de la technique d'analyse.

Pour la D, D-carboxypeptidase de M. smegmatis, nous sommes tentés de proposer le schéma suivant:



Il est également à souligner que, pour des systèmes D, D-carboxypeptidase-transpeptidases de Streptomyces sp., la transpeptidation se fait par un mécanisme bimoléculaire ordonné, l'accepteur s'associant le premier à l'enzyme (Frère et al., 1973) et que les accepteurs de la transpeptidation se comportent comme des inhibiteurs non-compétitifs de l'activité D, D-carboxypeptidasique.

CHAPITRE III

MATERIEL ET METHODES

I - PRODUITS.

Les réactifs qui ont été utilisés pour l'usage analytique sont des produits R.P. Prolabo et Merck. En outre, nous avons eu recours aux produits suivants:

albumine bovine, poudre (grade B) ..... Calbiochem.
alumine (grade bactériologique)..... Alcoa Chemicals ou Sigma, type 305.
sulfate de protamine ..... Serva
L-alanine (1-^{14}C) (18,2 mCi/mmole).... NEN
acide 2,6-diaminopimélique (1,7-^{14}C) (10,65 mCi/mmole).. NEN
ampicilline, carbénicilline et céphalosporine C ..... Glaxo Lab.
D-cyclosérine ..... Produits Roche.
Pénicilline G ..... SPECIA (spécilline G)
Vancomycine ..... Eli Lilly

L'éthambutol nous a été aimablement fourni par E.Lederer.

II - PREPARATION DES SUBSTRATS.

Les substrats utilisés pour l'essai de l'activité D,D-carboxypeptidasique sont soit l'UDP-MurNglyc-L-Ala-γ-D-Glu-meso-A2pm-D-(^{14}C)-Ala-D-(^{14}C)Ala soit des dérivés de ce dernier.

Ce substrat principal est préparé à partir de l'UDP-MurNglyc-L-Ala-γ-D-Glu-meso-A2pm par l'addition enzymatique de D-(^{14}C)Ala-D-(^{14}C)Ala qui est elle-même synthétisée à partir de L-(^{14}C) alanine par voie enzymatique. Les substrats ayant une forte activité spécifique sont dilués à la concentration désirée avec des substrats froids.

1 - Préparation des substrats froids: UDP-MurNglyc-pentapeptide et UDP-MurNglyc-tripeptide.

Mycobacterium phlei a été cultivé dans les mêmes conditions que M.smegmatis (voir Culture des microorganismes, Chapitre I). L'UDP-MurNglyc-tripeptide est accumulé dans des cultures traitées à la D-cyclosérine[x] qui est ajoutée aux 2/3 de la phase exponentielle de croissance à une concentration finale de 10 µg/ml.

De la même façon, l'UDP-MurNglyc-pentapeptide est accumulé par la vancomycine[x] à la concentration de 50 µg/ml. L'incubation continue

---

[x] Rappelons (voir figure 3 et Tableau I) que la D-cyclosérine bloque la biosynthèse de la D-Ala-D-Ala conduisant ainsi à l'accumulation dans les cellules d'UDP-MurNglyc-tripeptide et que la vancomycine, en empêchant le transfert du disaccharide-pentapeptide sur le peptidoglycane en croissance, conduit à l'accumulation d'UDP-MurNglyc-pentapeptide.

pendant 2 heures et les cellules sont récoltées par une centrifugation à 10.000 g x 20 min. Les cellules sont lavées une fois avec du tampon acétate d'ammonium 20 mM, pH 7,5 et centrifugées à la même vitesse. Le rendement est d'habitude 1,5 g poids frais par litre de milieu.

La purification des substrats se poursuit selon la méthode décrite par Petit et al. (1970). En bref, ce procédé consiste en : 1) une sonication (25 minutes par Ultrason-Annemasse, S.A., type 150, T.S.), 2) une centrifugation (27.500 g x 45 min.), 3) un traitement au TCA 5 % suivi d'une centrifugation comme précédemment, 4) la neutralisation par l'extraction du TCA avec de l'éther, 5) une filtration sur deux colonnes (88 x 2,5 cm) de Sephadex G-25 et G-15, reliées l'une à l'autre, et 6) une purification finale par chromatographie sur papier avec les solvants A et B (voir Méthodes analytiques).

Au cours de la purification, l'élution est suivie par la mesure de la densité optique à 260 nm et le dosage des hexosamines totales par la méthode d'Elson-Morgan (1933) modifiée par Belcher et al. (1954). La composition de la chaîne peptidique est vérifiée par l'analyse des acides aminés sur l'autoanalyseur Technicon. L'uridine est identifiée et dosée par son spectre d'absorption, ϵ = 10.000 à 260 nm.

Le produit purifié a donné les rapports molaires suivants:

	pour l'UDP-MurNglyc-tripeptide	et pour l'UDP-MurNglyc-pentapeptide
uridine	0,82	1,2
acide muramique	0,25	0,5
Ala	1,1	3,2
Glu	1,0	1,0
A_2pm	1,0	1,1

2- Préparation des substrats marqués au carbone-14.

2-1 D-(^{14}C)alanyl-D-(^{14}C)alanine:

Ce dipeptide est synthétisé à partir de la L-(^{14}C)alanine (18,2 mCi/mmole) à l'aide des enzymes de Streptococcus faecalis, qui contiennent la L-Ala: D-Ala racémase et la D-alanyl-D-alanine synthétase (Neuhaus, 1962). Ce travail a été effectué par A. Yapo avec les enzymes purifiés jusqu'à l'étape de la précipitation au sulfate de protamine. Le (^{14}C)-dipeptide est purifié par électrophorèse sur papier à pH 3,6 pendant 1,0 heure (à 45 V/cm). Nous avons obtenu la D-(^{14}C)alanyl-D-(^{14}C)alanine (30 mCi/mmole) avec un rendement d'environ 85 %.

2-2 UDP-MurNglyc-L-Ala-γ-D-Glu-meso-A_2pm-D-(^{14}C)Ala-D-(^{14}C)Ala

L'addition enzymatique de D-(^{14}C)Ala-D-(^{14}C)Ala à l'UDP-MurNglyc-tripeptide a été effectuée par l'enzyme d'addition obtenu à partir de

E. coli K 235, préparé selon la méthode de Comb (1962) par A. Yapo. Mais c'est la fraction précipitant entre 43 et 60 % de sulfate d'ammonium qui a été employée comme source d'enzymes. L'activité spécifique du produit UDP-MurNglyc-(^{14}C) pentapeptide est de 26 mCi/mmole avec 87 % de rendement.

2-3 N-glycolylmuramyl-(^{14}C) pentapeptide:

Ce substrat est préparé par l'hydrolyse ménagée (HCl, 0,04 N, 20 min. à 100°) de l'UDP-MurNglyc-(^{14}C)pentapeptide. L'UDP-MurNglyc-(^{14}C) pentapeptide 4,2 µmoles (10^7 cpm) dans un volume final de 5 ml a été incubé avec agitation continuelle dans les conditions ci-dessus dans un flacon de 25 ml. Le produit de l'hydrolyse est séparé par chromatographie sur papier avec le solvant d'élution C (voir Méthodes analytiques). La conversion en N-glycolylmuramyl-(^{14}C) pentapeptide est de 82 %.

2-4 N-glycolylmuramyl-(^{14}C)tétrapeptide:

Ce dérivé a été préparé en vue d'étudier des activités L, D-carboxypeptidasique et L, D-transpeptidasique éventuellement présentes dans les enzymes particulaires de M. smegmatis.

Nous avons eu recours à la D, D-carboxypeptidase de Streptomyces R 39, qui nous a été aimablement donnée par J.M. Ghuysen, pour couper la D-(^{14}C)Ala terminale à partir de MurNglyc-(^{14}C)pentapeptide (Ghuysen et al., b1974). Le milieu contenant du MurNglyc-(^{14}C)pentapeptide 0,54 mM, $MgCl_2$ 2,5 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, a été incubé avec 0,4 ml d'enzymes de R 39 (activité spécifique pour l'Ac_2-Lys-D-Ala-D-Ala = 0,6 nmole/min/ml) à 37° pendant 4 heures.

La conversion en MurNglyc-(^{14}C) tétrapeptide est de 94 % et le produit est purifié par électrophorèse sur papier à pH 3,6 (voir Méthodes analytiques).

III - METHODES BACTERIOLOGIQUES.

1- Milieu de Brodie.

Ce milieu de Brodie (1956) a été utilisé pour la culture de toutes les Mycobactéries employées au cours de cette étude. Le milieu comprend par litre:

Bactocasamino acid (Difco certified)		13 g
Tween 80 2 g	K_2HPO_4	1 g
Acide fumarique 0,6 g	$MgSO_4.7\ H_2O$	0,3 g
	$FeSO_4.7\ H_2O$	0,02 g

Le milieu est ajusté à pH 7,0 avec du KOH 20 %. Après les avoir répartis dans des Erlens, les milieux sont stérilisés à l'autoclave pendant 30 minutes à 120°.

2- Milieu au "Heart Bouillon".

2-1 Boite de Petri - "Heart Bouillon" gélosé:

Le bouillon est préparé avec les ingrédients suivants dans un litre: "Heart Infusion Broth (Difco)" 25 g , "Bactopeptone (Difco)" 10 g, et glycérol 40 ml. Le milieu est ajusté à pH 7, 0 avec HCl, puis 15 g de "Nutrient Agar (Difco)" sont ajoutés. Après avoir autoclavé pendant 30 minutes à 120°, le milieu est réparti stérilement dans des boites de Petri à raison de 20 ml par boite.

2-2 Tubes inclinés de "Heart Bouillon" à la gélose molle:

Le bouillon est préparé de la même façon que précédemment, mais on ajoute cette fois-ci 8 g de "Nutrient Agar". 5, 5 ml de ce bouillon sont répartis dans des tubes (gélose en tubes inclinés).

3- Milieu de Jensen.

Ces milieux inclinés ont été achetés à l'Institut Pasteur, Paris.

3-1 Milieu de Jensen sans antibiotique:

C'est sur ce milieu que les différentes souches de Mycobactéries (M. smegmatis et M. phlei) ont été conservées à 4°.

3-2 Milieu de Jensen imprégné d'antibiotiques:

Nous avons utilisé des tubes inclinés de milieu de Jensen imprégnés d'antibiotiques aux concentrations suivantes:
rifampicine (0, 2, 4, 10 µg), streptomycine (0, 10, 20, 40 µg), D-cyclosérine (0, 20, 30, 40 µg) et éthambutol (0, 1, 2, 3 µg).

4- Culture sur boite de Petri.

Sur le"Heart Bouillon" à la gélose dure préalablement coulé dans la boite de Petri (20 ml), sont coulés 5 ml d'une suspension de M. smegmatis dans du "Heart Bouillon" à la gélose molle. Des disques de chaque antibiotique sont alors placés sur la surface des boites de Petri qui sont incubées à 37°. L'action éventuelle des antibiotiques, c'est-à-dire l'absence de croissance bactérienne se traduit par une zone claire autour du disque. Les antibiotiques ont été utilisés aux doses suivantes: méthicilline (10 µg/ml), céphaloridine (30 µg/ml), carbénicilline (100 µg/ml), oxacilline (10 µg/ml), ampicilline (10 µg/ml), rifampicine (30 µg/ml) et streptomycine (30 µg/ml).

IV - METHODES ANALYTIQUES.

1- Essai standard de l'activité D, D-carboxypeptidasique.

L'activité D, D-carboxypeptidasique est caractérisée par la libération de la D-alanine terminale à partir du substrat acyl-D-Ala-D-Ala au cours de l'incubation avec les enzymes.

Le mélange réactionnel typique contient dans un volume final de 50 µl: UDP-N-glycolylmuramyl-L-Ala-γ-D-Glu-meso-A_2pm-D-(^{14}C)-Ala-D-(^{14}C)Ala 0,5-2,0 mM (3,31 x 10^4 cpm), sodium cacodylate-HCl 20 mM, pH 6,1, $MgCl_2$ 10 mM, Triton X-100 0,5 % et des enzymes particulaires 80-400 µg en protéines. L'incubation est effectuée à 30° pendant une heure et demie, et la réaction enzymatique est arrêtée dans l'eau bouillante pendant 3 minutes.

Les échantillons inactivés sont déposés sur du papier Whatman 3 MM et soumis à l'électrophorèse à pH 3,6 pendant 3/4 d'heure. Les produits séparés sont révélés soit par le réactif ninhydrine/collidine soit par autoradiographie, et sont découpés pour compter la radioactivité.

Le pourcentage de D-(^{14}C) alanine libérée est calculé d'abord par rapport à la radioactivité totale. Donc, 100 % de libération indique que tous les résidus D-(^{14}C)alanine, terminale et pénultième, sont libérés par l'action des D, D-carboxypeptidases suivies par les L, D-carboxypeptidases. Il est ensuite converti en nmole de D-(^{14}C)alanine pour calculer l'activité spécifique de l'enzyme.

2- Dosage des protéines.

Les protéines sont dosées selon la méthode de Lowry et al. (1951) la sérumalbumine bovine servant de standard.
Du dodécylsulfate de sodium (à la concentration finale de 1 %) est utilisé pour mettre en solution les protéines membranaires avant le dosage. Les protéines des enzymes solubilisés sont dosées en présence de Triton X-100 1 %. Les détergents employés n'interfèrent pas avec le dosage.

3- Composition en acides aminés.

La composition en acides aminés des produits a été déterminée à l'aide de l'appareil Technicon.

Les échantillons contenant de 50 à 100 nmoles de chaque acide aminé sont d'abord hydrolysés dans des tubes scellés (HCl 6 N, 110°, 16 heures). Les hydrolysats sont séchés dans un dessiccateur sous vide sur pastilles de soude. Après avoir repris les échantillons secs dans l'eau distillée, A. Yapo a aimablement pris en charge de les analyser sur l'autoanalyseur Technicon, la norleucine servant de standard interne.

4- Dosage des hexosamines totales par la méthode de Elson-Morgan modifiée par Belcher et al.(1954).

Les échantillons contenant 50 à 100 nmoles d'osamines sont hydrolysés dans un tube scellé (HCl 4 N, 100°, 4 heures), puis séchés par lyophilisation.

Réactif:

- Réactif à l'acétylacétone: 0,3 ml d'acétylacétone dans 10 ml de carbonate de sodium 1,25 N.
- Réactif d'Ehrlich : 480 mg de paradiméthylaminobenzaldéhyde dans 9 ml d'HCl concentré.

Technique:

Les échantillons lyophilisés sont repris par 0,6 ml d'eau distillée. On ajoute alors 0,2 ml de réactif à l'acétylacétone et l'on maintient les tubes au bain-marie à 100° pendant 10 minutes. Après avoir refroidi, on ajoute 1 ml d'alcool éthylique (absolu) et 0,2 ml de réactif d'Ehrlich. On chauffe les tubes au bain-marie à 75° pendant 30 minutes, puis on refroidit et laisse 30 minutes à l'obscurité.

On lit la coloration à 510 nm; elle est rose-saumon pour l'acide muramique et rose-violacé pour la glucosamine. La gamme est faite avec 25, 50, 75 et 100 nmoles de glucosamine et d'acide muramique. 18 heures après, on lit de nouveau à 530 nm et on prend le rapport $D.O._{510}/D.O._{530}$. Le rapport est de 0,8 à 1,0 pour glucosamine et 2,5 à 3,1 pour l'acide muramique.

5- Méthodes de séparation.

5-1 Chromatographie sur colonne:

colonne : 88 cm x 2,5 cm de diamètre
solvant d'élution : NH_4Ac 20 mM, pH 7,5
support : Sephadex G-25 et G-15 (Pharmacia Fine Chemicals).
mesure : $D.O._{260}$ au spectrophotomètre Zeiss PMQ II.

5-2 Chromatographie sur papier:

support : papier Whatman 3 MM (46 x 57 cm).
solvant :(A) acide isobutyrique: ammoniaque N = 10:6.
(B) éthanol:acétate d'ammonium M, pH 7,5 = 7,5:3.
(C) n-butanol:acide acétique: pyridine: eau = 15:3:10:12.

5-3 Electrophorèse sur papier:

Elle est réalisée sous Varsol (White spirit) dans un appareil d'électrophorèse à haute tension Gilson, modèle D, avec du tampon à pH 3,6 composé de pyridine:acide acétique:eau (= 1:10:90). On utilise comme support du papier Whatman 3 MM (46 x 57 cm). La durée de l'électrophorèse est en général de 3/4 d'heure à 45 V/cm (voir la migration dans le Tableau IX).

Tableau IX

Constantes de migration des substances en électrophorèse à pH 3, 6 (45 V/cm) et en chromatographie avec du solvant (C). Le support est le papier Whatman 3 MM.

Substance	Chromatographie [x] (RUDP-MurNglyc-tri)	Electrophorèse [xx] (RAla)
UDP-MurNglyc-pentapeptide	1,25	+ 2,6
UDP-MurNglyc-tripeptide	1,00	+ 2,8
Phospho-MurNglyc-pentapeptide	1,25	+ 2,1
MurNglyc-pentapeptide	2,92	+ 1,1
MurNglyc-tetrapeptide	-	+ 0,9
D-alanine	-	- 1,0
D-alanyl-D-alanine	-	- 2,6

[x] :en 48 heures le solvant (C) dépasse le front du papier.

[xx] :(+) et (-) = direction de la migration électrophorétique à pH 3, 6 vers l'anode et vers la cathode, respectivement.

5-4 Révélation des chromatogrammes et des électrophorégrammes:

Les papiers sont séchés dans une étuve ventilée à 70°, 30 minutes.
1) Révélation des acides aminés et peptides : réactif à la ninhydrine/ collidine (ninhydrine 1 g, éthanol absolu 500 ml, acide acétique 100 ml et collidine 20 ml).

Le réactif est pulvérisé sur le papier qui est ensuite chauffé à 70° pendant 10 minutes.

2) Révélation des sucres aminés N-acylés: réactif de Sharon et Seifter (1964). Le papier est trempé dans NaOH 0, 5 N dans l'éthanol: 1-propanol (6: 4, v/v), puis chauffé à 120° pendant 5 minutes. On observe alors à l'ultraviolet des taches fortement fluorescentes.

3) Le groupe UDP est détecté par l'absorption à la lampe UV.

4) Produits radioactifs. Les papiers sont soumis à l'autoradiographie pendant une semaine sur film Kodak radiographique. La radioactivité sur bande est repérée avec le radiochromatogramme scanner, Packard, modèle 7200.

5-5 Comptage de la radioactivité:

Les mesures de radioactivité sont effectuées à l'aide d'un spectromètre à scintillation du type Packard Tri-Carb 3375.

Les taches radioactives repérées à l'aide du lecteur de radioactivité par autoradiographie, ou par comparaison avec des témoins froids révélés à la ninhydrine, sont découpées et comptées après immersion dans 10 ml du mélange scintillant. Le mélange scintillant renferme dans un litre de toluène de grade scintillant (Merck), 4 g d'OMNIFLUOR (NEN, un mélange de 98 % de PPO et 2 % de Bis-MSB).

5-6 Gel de phosphate de calcium:

Ce gel d'hydroxyapatite, $Ca_5(PO_4)_3OH$, est préparé selon la technique décrite par Levin (1962) en vue de recueillir les enzymes solubles éventuellement sécrétés dans le milieu de culture. Le gel a d'autre part, servi comme support de chromatographie pour la purification préliminaire de l'enzyme D, D-carboxypeptidase.

RESUME ET CONCLUSION

Les fragments de membrane cytoplasmique de Mycobacterium smegmatis ATCC 21732, obtenus par broyage à l'alumine et appelés "enzymes particulaires", agissant sur le substrat UDP-N-glycolyl-muramyl-L-Ala-γ-D-Glu-meso-A_2pm-D-[^{14}C]Ala-D-[^{14}C]Ala présentent deux activités enzymatiques: une activité D, D-carboxy-peptidasique et une activité L, D-carboxypeptidasique.

Dans les conditions employées au cours de ce travail, l'activité L, D-carboxypeptidasique est très faible et seule l'activité D, D-carboxy-peptidasique a été étudiée.

Les conditions optimales de cette activité ont été établies: cacodylate de sodium-HCl 20 mM, pH 6, 1, $MgCl_2$ 10 mM, Triton X-100 0, 5 % et incubation à 30°.

L'activité D, D-carboxypeptidasique est en partie soluble en présence de détergents non-ioniques tels que le Triton X-100 et le Genapol X-100, ce qui provoque une augmentation de 2, 5 fois de l'activité D, D-carboxypeptidasique de M. smegmatis.

Le Km et le V pour l'activité D, D-carboxypeptidasique des enzymes solubilisés et des enzymes particulaires étudiés en présence de Triton X-100 (0, 5 %) sont les mêmes:
Km = 16, 7 mM pour le substrat UDP-MurNglyc-L-Ala-γ-D-Glu-meso-A_2pm-D-[^{14}C]Ala-D-[^{14}C]Ala, et V = 250 nmoles/heure/mg protéine membranaire. La valeur du Km est de l'ordre de grandeur de celles établies pour des enzymes identiques dans d'autres microorganismes mais le V est plus faible que ceux décrits dans la littérature.

La conservation à -20° pendant 6 semaines a induit un changement de Km de 16, 7 mM pour des enzymes frais à 5, 1 mM pour des enzymes conservés. Nous avons observé que l'activité D, D-carboxypeptidasique conservée sous forme d'enzymes particulaires a subi une perte d'efficacité catalytique (V/Km) de 10 % et que l'activité sous forme d'enzymes solubilisés a subi une perte de 20 %.

La souche de M. smegmatis que nous avons étudiée est insensible à la pénicilline, la croissance n'étant inhibée qu'à 200 µg/ml (MIC) de pénicilline G. Elle s'est montrée également résistante aux autres antibiotiques du type β-lactame (ampicilline, carbénicilline, méthicilline,

oxacilline, et céphaloridine) à la concentration d'environ 10 µg/ml. L'éthambutol est un fort inhibiteur exerçant son inhibition sur la croissance de M. smegmatis à 0,5 µg/ml (MIC).

L'activité D,D-carboxypeptidasique, elle, est inhibée à de très faibles concentrations en pénicilline G. 50 % de l'activité sont inhibés à 0,5 µg/ml de pénicilline G. Au contraire, aucune inhibition de l'activité D,D-carboxypeptidasique ne s'est révélée à une forte concentration d'éthambutol (100 µg/ml).

D'après ces résultats, on peut supposer que l'activité D,D-carboxypeptidasique n'est apparemment pas le site cible de l'action léthale de la pénicilline. Il reste cependant à vérifier s'il n'existe pas un obstacle à la pénétration de la pénicilline jusqu'à la membrane cytoplasmique: barrière de perméabilité ou production importante de β-lactamases.

En ce qui concerne l'éthambutol qui exercerait son inhibition au niveau de la transpeptidation "atypique", i.e. meso-A2pm-meso-A2pm, qui constitue en effet un tiers des liaisons interpeptidiques dans le réseau du peptidoglycane chez certaines souches de Mycobactéries y compris M. smegmatis, il n'est pas surprenant qu'il soit sans action sur une D,D-carboxypeptidase.

Après l'inhibition complète de l'enzyme par la pénicilline G, 30 % de l'activité peut être restaurée par une dialyse de 8 heures à la température du laboratoire. Ce résultat nous mène à deux voies d'interprétation:
a) la fixation de la pénicilline ne se fait pas par une liaison covalente, mais par une liaison non-covalente qui est très forte. Il en résulte alors que la dialyse conduit à la restauration partielle de l'activité enzymatique.
b) la pénicilline se fixe sur l'enzyme cible par une liaison covalente (ou par acylation) et la réactivation provient de la catalyse enzymatique elle-même. Des données récentes montrent en effet que la pénicilline elle-même est un des substrats de la D,D-carboxypeptidase.

L'étude cinétique effectuée avec des enzymes particulaires et avec des enzymes solubilisés nous a permis de voir que l'inhibition par la pénicilline G semble non-compétitive avec un Ki de $4,2.10^{-6}$M. Cette constante K_i varie lors de la conservation des enzymes. Les enzymes conservés à -20° pendant 6 semaines sous forme d'enzymes particulaires ont donné un K_i de 2,4 fois plus élevé, tandis que ceux conservés sous forme d'enzymes solubilisés ont donné un K_i plus de 7 fois plus élevé.

En considérant les changements d'efficacité catalytique et de K_i apportés par la conservation, nous sommes tentés d'interpréter ce phénomène en supposant qu'il y a eu un changement de la conformation de la manière suivante:
a) la transconformation de l'enzyme a apporté une plus haute affinité pour le substrat mais en même temps une vitesse catalytique beaucoup plus basse.
b) l'efficacité fonctionnelle de l'enzyme a diminué d'une façon non-concomittante au changement de l'affinité pour la pénicilline. L'inhibition "non-compétitive" pourrait bien s'interpréter en admettant que la fixation de la pénicilline ne se fait pas exactement comme celle du substrat employé.

En effet, un certain nombre de D, D-carboxypeptidases fonctionnent comme transpeptidases et vice-versa selon les conditions expérimentales conduisant à l'hypothèse de "carboxypeptidase couplée". Cette hypothèse permet d'envisager un site catalytique de l'enzyme qui comprend deux sous-sites pour l'accepteur et le donneur de la transpeptidation, respectivement.

Il est à noter que, pour des D, D-carboxypeptidase-transpeptidases de Streptomyces sp., les accepteurs de la transpeptidation se comportent comme des inhibiteurs non-compétitifs de l'activité D, D-carboxypeptidasique.

A cet égard est proposé un mécanisme schématique de l'action de la pénicilline sur l'activité D, D-carboxypeptidasique de M. smegmatis.

Nous constatons néanmoins, que les résultats décrits ici doivent être plus compliqués que l'interprétation que nous en avons donnée, et qu'il nous reste à faire beaucoup d'autres expériences pour élucider la fonction exacte de la D, D-carboxypeptidase dans la cellule ainsi que le mécanisme de son inhibition par la pénicilline.

SUMMARY

The membrane fragments of Mycobacterium smegmatis ATCC 21732, prepared by the method of grinding with alumina, exhibited both D, D-carboxypeptidase activity and L, D-carboxypeptidase activity. The substrate used was UDP-N-glycolylmuramyl-L-Ala-γ-D-Glu-meso-A2pm-D-(^{14}C)Ala-D-(^{14}C)Ala.

Under the conditions employed for the study of D, D-carboxypeptidase activity, the L, D-carboxypeptidase activity was very weak.

The optimum conditions for the D, D-carboxypeptidase activity were determined to be: 20 mM sodium cacodylate-HCl, pH 6, 1, 10 mM $MgCl_2$, 0, 5 % Triton X-100, and incubation at 30°.

The D, D-carboxypeptidase activity was partly solubilized by non-ionic detergents such as Triton X-100 and Genapol X-100. In the presence of these detergents, the particulate enzymes showed a 2, 5-fold increase of D, D-carboxypeptidase activity. The solubilized enzymes lost D, D-carboxypeptidase activity faster than the particulate enzymes upon storage.

Preliminary attempts to purify the membrane-bound D, D-carboxypeptidase of M. smegmatis were made on the proteins solubilized by 1 % Genapol X-100.

The Km and V values of D, D-carboxypeptidase activities of both particulate enzymes and solubilized enzymes were found to be identical in the presence of 0, 5 % Triton X-100: Km = 16, 7 mM for UDP-MurNglyc-L-Ala-γ-D-Glu-meso-A2pm-D-(^{14}C)Ala-D-(^{14}C)Ala, and V = 250 nmoles/hr/mg protein.

The storage of enzymes for 6 weeks at -20° was found to induce a change of Km from 16, 7 mM to 5, 1 mM. This storage effect on Km value was accompanied by the loss of catalytic efficiency (V/Km) of the order of 10 % for the particulate enzymes and of 20 % for the solubilized enzymes.

It was found that the minimal inhibitory concentration of the growth of M. smegmatis was 200 µg/ml of penicillin G. This microorganism was insensitive at 10 µg/ml level of other β-lactam antibiotics such as ampicillin, carbenicillin, methicillin, oxacillin and cephaloridine.

Ethambutol was a potent inhibitor of cell growth, the inhibition being exerted at 0, 5 µg/ml.

On the other hand, the D, D-carboxypeptidase activity was inhibited at a remarkably low concentration of penicillin G (ID_{50} = 0,5 µg/ml), while no inhibition of enzymic activity was observed with ethambutol even at a concentration of 100 µg/ml.

It is thus supposed that the D, D-carboxypeptidase activity is apparently not a lethal target of penicillin action. It remains, however, to verify if there are not any barriers which keep the penicillin from penetrating to its targets or any high production of active penicillinases by intact cells.

As to the effect of ethambutol, it is hypothesized that this antibiotic exerts its inhibitory action on the level of transpeptidation of "atypical" type, i.e. , meso-A_2pm-meso-A_2pm, which actually constitutes almost a third of interpeptide linkages of the peptidoglycan network of several species of Mycobacteria including M. smegmatis.

Following a complete inactivation of D, D-carboxypeptidase activity of M. smegmatis by penicillin G, a maximum 30 % of enzymic activity was restored by dialysis for 8 hours at room temperature.

This experimental result seems to give rise to one of the two following interpretations: a) penicillin binding is not through a covalent bond but through a very strong non-covalent one, thus enabling at least partial reactivation of enzymic activity by simple dialysis. b) Penicillin binds covalently (or by acylation) on the enzyme and the reactivation of enzymic activity is attributed to the enzymatic catalysis on the penicillin itself. In fact, recent research provides evidences that the penicillin undergoes a catalytic degradation as if it served as a substrate for the D, D-carboxypeptidases.

The kinetic studies of inhibition carried out with the particulate enzymes and solubilized enzymes revealed that the inhibition by penicillin G was of a non-competitive type with a Ki of $4,2.10^{-6}$M.

The constant Ki was found to vary with the storage conditions: the D, D-carboxypeptidase activity which was stored for 6 weeks at -20° in the form of particulate enzymes gave a 2,4-fold increased Ki, while that stored in the form of solubilized enzymes gave a Ki more than 7-fold increased.

Taking into account the change in catalytic efficiency and in Ki brought about by storage, it seems evident that some conformational change of D, D-carboxypeptidase has occurred in the following ways. a) Transconformation of the enzyme resulted in a higher affinity for the substrate but much lower catalytic velocity at the same time.

b) Functional efficiency of the enzyme was apparently altered in a way non-concomittant to that of the affinity for penicillin.

The non-competitive type of inhibition might provide additional explanations in support of these arguments.

In fact, some D, D-carboxypeptidases are known to function as transpeptidases and vice versa according to the experimental conditions, leading to the hypothesis that transpeptidases are "coupled carboxypeptidases". This hypothesis presumes that this kind of enzymes possesses a catalytic site which encompasses two subsites, one for the acceptor and the other for the donor of transpeptidation respectively.

It seems worth mentioning that, with the D, D-carboxypeptidase-transpeptidases of Streptomyces sp., the acceptors for transpeptidation reaction behave as non-competitive inhibitors of D, D-carboxypeptidase activity.

In this regard is proposed a schematic mechanism of penicillin action on the D, D-carboxypeptidase of M. smegmatis.

It is certain, however, that the results described here should be more complex to interpret than has been attempted and they surely call for further discussions and complementary experiments.

BIBLIOGRAPHIE

1 - Araki, Y., Shimada, A. et Ito, E.
(1966) Biochem. Biophys. Res. Commun. 23, 518-525.

2 - Azuma, I., Thomas, D.W., Adam, A., Ghuysen, J.M., Bonaly, R., Petit, J.F. et Lederer, E.
(1970) Biochim. Biophys. Acta, 208, 444-451.

3 - Barnette, H.J.
(1973) Biochim. Biophys. Acta, 304, 332-352.

4 - Belcher, R., Nutten, A.J. et Sonnbrook, C.M.
(1954) Analyst. 79, 201-208.

5 - Blumberg, P.M. et Strominger, J.L.
(1971) Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 68, 2814-2817.

6 - Blumberg, P.M. et Strominger, J.L.
(1974) Bacteriol. Rev. 38, 291-335.

7 - Bogdanovsky, D., Bricas, E. et Dezélée, P.
(1969) C.R.Acad. Sci. Paris, Sér.D. 269, 390-393.

8 - Brodie, A.F. et Gray, C.T.
(1956) J. Biol. Chem. 219, 853-862.

9 - Citri, N. et Pollock, M.P.
(1966) Advances in Enzymology, 28, 237-323.

10 - Comb, D.G.
(1962) J. Biol. Chem. 237, 1601-1604.

11 - Coyette, J., Perkins, H.R., Polacheck, I., Shockman, G.D. et Ghuysen, J.M.
(1974) Eur. J. Biochem. 44, 459-468.

12 - Diaz-Maurino, T., Nieto, M. et Perkins, H.R.
(1974) Biochem. J. 143, 391-402.

13 - Dixon, M.
(1953) Biochem. 55, 170-171.

14 - Elson, L.A. et Morgan, W.T.J.
(1933) Biochem. J. 27, 1824-1828.

15 - Florey, H.W., Chain, E., Heatley, N.G., Jennings, M.A., Sanders, A.G., Abraham, E.P. et Florey, M.E.
(1949) Antibiotics, 2, 803, Oxford, Univ.Press, London.

16 - Forbes, M., Kuck, N.A. et Peets, E.A.
(1965) J. Bacteriol. 89, 1299-1305.

17 - Frère, J.M., Ghuysen, J.M., Perkins, H.R. et Nieto, M.
(1973) Biochem. J. 135, 483-492.

18 - Frère, J.M., Ghuysen, J.M., Reynolds, P.E., Moreno, R. et Perkins, H.R.
(1974) Biochem. J. 143, 241-249.

19 - Frère, J.M., Ghuysen, J.M., Degelaen, J., Loffet, A. et Perkins H.R.
(1975) Nature, 258, 168-170.

20 - Frère, J.M., Ghuysen, J.M., Vanderhaeghe, H., Adriaens, P. Degelaen, J. et De Graeve, J.
(1976) Nature, 260, 451-454.

21 - Gale, G.R. et McLain, H.H.
(1963) J. Bacteriol. 86, 749-756.

22 - Ghuysen, J.M.
(1968) Bacteriol. Rev. 32, 425-464.

23 - Ghuysen, J.M. et Shockman , G.D.
(1973) Bacterial Membranes and Walls, Leive, L. edn. 37-130, Marcel Dekker Inc. N.Y.

24 - a Ghuysen, J.M., Leyh-Bouille, M., Frère, J.M., Dusart, J., Marquet, A., Perkins, H.R. et Nieto, M.
(1974) Ann. N.Y. Acad. Sci. 235, 236-268.

25 - b Ghuysen, J.M., Reynolds, P.E., Perkins, H.R., Frère, J.M., Moreno, R.
(1974) Biochem. 13, 2539-2547.

26 - Ghuysen, J.M., Frère, J.M., Leyh-Bouille, M., Dusart, J., Nguyen-Distèche, M., Coyette, J., Marquet, A., Perkins, H.R. et Nieto, M.
(1975) Bulletin de l'Institut Pasteur, 73, 101-140.

27 - Gondré, B., Flouret, B. et van Heijenoort, J.
(1973) Biochimie, 55, 685-691.

28 - Hammarström, S. et Strominger, J.L.
(1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 3463-3467.

29 - Izaki, K., Matsuhashi, M. et Strominger, J.L.
(1966) Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 55, 656-663.

30 - Izaki, K., Matsuhashi, M. et Strominger, J.L.
(1968) J. Biol. Chem. 243, 3180-3192.

31 - Izaki, K. et Strominger, J.L.
(1968) J. Biol. Chem. 243, 3193-3201.

32 - Kotani, S., Yanakida, I., Kato, K. et Matsuda, T.
(1970) Biken J. 13, 249-275.

33 - Lawrence, P.J. et Strominger, J.L.
(1970) J. Biol. Chem. 245, 3660-3666.

34 - Lederer, E.
(1971) Pure and Applied Chemistry, 25, 135-165.

35 - Lederer, E., Adam, A., Ciorbaru, R., Petit, J.F. et Wietzerbin, J.
(1975) Molecular and Cellular Biochemistry, 7, 87-104.

36 - Lederer, E.
(1975) Communication personnelle.

37 - Levin, O.
(1962) Methods in Enzymology, 5, 27-32.

38 - Leyh-Bouille, M., Ghuysen, J.M., Bonaly, R., Nieto, M., Perkins, H.R., Schleifer, K.H. et Kandler, O.
(1970) Biochem. 9, 2961-2970.

39 - a Leyh-Bouille, M., Ghuysen, J.M., Nieto, M., Perkins, H.R., Schleifer, K.H. et Kandler, O.
(1971) Biochem. 9, 2971-2975.

40 - b Leyh-Bouille, M., Coyette, J., Ghuysen, J.M., Idczak, J., Perkins, H.R. et Nieto, M.
(1971) Biochem. 10, 2163-2170.

41 - Leyh-Bouille, M., Nakel, M., Frère, J.M., Johnson, K., Ghuysen, J.M., Nieto, M. et Perkins, H.R.
(1972) Biochem. 11, 1290-1298.

42 - Lineweaver, H. et Burk, D.
(1934) J. Amer. Chem. Soc. 56, 658-666.

43 - Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. et Randall, R.J.
(1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275.

44 - Martin, H.H., Maskos, C. et Burger, R.
(1975) Eur. J. Biochem. 55, 465-473.

45 - Muftic, M.K.
(1962) Experientia, 18, 17-18.

46 - Neuhaus, F.
(1962) J. Biol. Chem. 237, 778-786.

47 - Park, J.T. et Burman, L.
(1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 51, 863-868.

48 - Petit, J.F., Adam, A., Wietzerbin, J., Lederer, E. et Ghuysen, J.M.
(1969) Biochem. Biophys. Res. Commun. 35, 478-485.

49 - Petit, J.F., Adam, A. et Wietzerbin, J.
(1970) FEBS Letters, 6, 55-57.

50 - Pollock, M.R.
(1965) Biochem. J. 94, 666-675.

51 - Pollock, J.J., Nguyen-Distèche, M., Ghuysen, J.M., Coyette, J., Linder, R., Salton, M.R.J., Kim, K.S., Perkins, H.R. et Reynolds, P.
(1974) Eur. J. Biochem. 41, 439-446.

52 - Pollock, J.J., Ghuysen, J.M., Linder, R., Salton, M.R.J., Perkins, H.R., Nieto, M., Leyh-Bouille, M., Frère, J.M. et Johnson, K.
(1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 662-666.

53 - Rogers, H.J. et Perkins, H.R.
(1968) Cell Walls and Membranes, E. and F.N. Spon.Ltd., London.

54 - Salton, M.R.J.
(1952) Biochim. Biophys. Acta, 8, 510-519.

55 - Salton, M.R.J.
(1964) The Bacterial Cell Wall, Elsevier Pub. Co. Amsterdam.

56 - Schleifer, K.H. et Kandler, O.
(1972) Bacteriol. Rev. 36, 407-477.

57 - Schleifer, K.H.
(1975) Z. Immun.-Forsch. Bd. 149, S, 104-117.

58 - Sharon, N. et Seifter, S.
(1964) J. Biol. Chem. 239, PC 2398-PC 2399.

59 - Sharpe, A., Blumberg, P.M. et Strominger, J.L.
(1974) J. Bacteriol. 117, 926-927.

60 - Spratt, B.G.
(1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 72, 2999-3003.

61 - Strominger, J.L., Izaki, K., Matsuhashi, K. et Tipper, D.J.
(1967) Fed. Proc. 26, 9-22.

62 - Strominger, J.L., Willoughby, E., Kamiryo, T., Blumberg, P.M. et Yocum, R.R.
(1974) Ann. N.Y. Acad. Sci. 235, 210-224.

63 - Suginaka, H., Blumberg, P.M. et Strominger, J.L.
(1972) J. Biol. Chem. 247, 5279-5288.

64 - Suginaka, H., Ichikawa, A. et Kotani, S.
(1975) Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 7, 629-635.

65 - Tipper, D.J. et Strominger, J.L.
(1965) Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 54, 1133-1141.

66 - a Umbreit, J.N. et Strominger, J.L.
(1973) J. Biol. Chem. 248, 6759-6766.

67 - b Umbreit, J.N. et Strominger, J.L.
(1973) J. Biol. Chem. 248, 6767-6771.

68 - Weidel, W. et Pelzer, H.
(1964) Advances in Enzymology, 26, 193-232.

69 - Wietzerbin, J., Das, B.C., Azuma, I., Adam. A., Petit, J.F. et Lederer, E.
(1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 57-63.

70 - Wietzerbin, J., Das, B.C., Gros, C., Petit, J.F. et Lederer, E.
(1973) Eur. J. Biochem. 32, 525-532.

71 - Wietzerbin, J., Das, B.C., Petit, J.F., Lederer, E., Leyh-Bouille, M. et Ghuysen, J.M.
(1974) Biochem. 13, 3471-3476.

72 - Wise, E.M. Jr. et Park, J.T.
(1965) Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 54, 75-81.

73 - Yocum, R.R., Blumberg, P.M. et Strominger, J.L.
(1974) J. Biol. Chem. 249, 4863-4871.